

АПОПТОЗ И АУТОФАГИЯ В КЛЕТКАХ ГЕПАТОКАРЦИНОМЫ, ИНДУЦИРОВАННЫЕ РАЗЛИЧНЫМИ ФОРМАМИ СОЛЕЙ ЛИТИЯ

© Н. П. Бгатова,¹ Ю. С. Гаврилова, А. П. Лыков, А. О. Соловьева,
В. В. Макарова, Ю. И. Бородин, В. И. Коненков

Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии,
Новосибирск, 630060; ¹электронный адрес: bgatova@ngs.ru

Гепатокарцинома является одной из агрессивных и устойчивых к лекарственной терапии опухолей человека. Полагают, что ее развитие коррелирует с нарушением регуляции запрограммированной клеточной гибели, поэтому поиск эффективных индукторов гибели клеток гепатокарциномы является весьма актуальным. Целью настоящей работы было сравнительное изучение влияния различных форм солей лития на развитие структурных изменений, приводящих к гибели клеток гепатокарциномы. Методами световой и электронной микроскопии, а также проточной цитофлуориметрии определены структурные признаки развития апоптоза и аутофагии в клетках гепатокарциномы при культивировании с различными формами солей лития. Показано, что более выраженное действие на клетки гепатокарциномы-29 оказывали наноразмерные формы карбоната и цитрата лития. При этом наноразмерная форма цитрата лития преимущественно индуцировала апоптоз, а наноразмерная форма карбоната лития — наряду с апоптозом аутофагическую гибель клеток гепатокарциномы.

Ключевые слова: карбонат и цитрат лития, наноразмерные формы карбоната и цитрата лития, гепатокарцинома-29, апоптоз, аутофагия.

Принятые сокращения: ГК-29 — гепатокарцинома-29, ХЛ — хлорид лития, КЛ — карбонат лития, исходная форма, КЛн — карбонат лития, наноразмерная форма, ЦЛ — цитрат лития, исходная форма, ЦЛн — цитрат лития, наноразмерная форма.

Гепатокарцинома (ГК) является одной из распространенных, агрессивных и устойчивых к лекарственной терапии опухолей человека (Shen, Cao, 2012). Полагают, что развитие ГК коррелирует с нарушением регуляции запрограммированной клеточной гибели (Degterev, Yuan, 2008). В составе запрограммированной клеточной гибели выделяют несколько вариантов, которые можно объединить по характеру развития в основные типы: апоптоз, аутофагическая гибель и запрограммированный некроз (Edinger, Thompson, 2004). Считается, что в клетках ГК могут развиваться некроз, апоптоз и аутофагия (Cui et al., 2013). Некроз часто стимулирует местное и системное воспаление, апоптоз и аутофагия же не вызывают подобного эффекта, поэтому их рассматривают как терапевтические мишени для лечения рака (Zhang et al., 2016).

Известно, что одни и те же внеклеточные сигнальные молекулы и внутриклеточные мессенджерные системы стимулируют различные, часто противоположные клеточные реакции — от пролиферации до апоптоза (Gomperts et al., 2013). В регуляции апоптоза участвуют молекулы различных сигнальных путей. Так, выделяют сигнальный путь Wnt, неотъемлемым компонентом которого является его негативный регулятор — гликоген-синтаза киназа-3 β (ГСК-3 β) (McCubrey et al., 2016). Ингибирование ГСК-3 β влияет на клеточную пролиферацию и развитие апоптоза, в частности при колоректальном раке, раке

поджелудочной железы и раке яичников (Wang et al., 2008; De Araujo et al., 2015).

Существует 5 классов ингибиторов ГСК-3 β . К одному из них относятся соединения лития (Quiroz et al., 2004). Показано, что карбонат лития (КЛ), действуя через подавление активности ГСК-3 β и снижение экспрессии циклина Е, может вызывать остановку пролиферации за счет ареста клеточного цикла в фазе G₂/М опухолевых клеток (Erdal et al., 2005; Tsui et al., 2012), а также индуцировать апоптоз опухолевых клеток (Li et al., 2015). Появляются данные о том, что литий модулирует аутофагию в раковых клетках (O'Donovan et al., 2015).

Однако применение препаратов лития может быть ограничено его токсичным действием на организм (Chiu et al., 2013). Ранее мы выявили, что наноразмерные формы солей лития оказывают более выраженное действие на клетки ГК в концентрациях, меньших, чем их исходные формы, что может обусловить более эффективное использование низких доз препаратов (Гаврилова и др., 2016). Кроме того, на основании морфологического разделения клеток ГК по стадиям дифференцировки (Бгатова и др., 2015) нами выявлены различные типы клеток — мишеней цитрата и карбоната лития исходных (КЛ и ЦЛ) и наноразмерных форм (КЛн и ЦЛн), что позволило высказать предположение о возможном запуске разных механизмов клеточной гибели (Гаврилова и др., 2016). По-

этому целью настоящей работы стало выявление структурных изменений, приводящих клетки ГК к гибели при действии солей лития.

Материал и методика

Работа выполнена на культуре клеток гепатокарциномы-29 (ГК-29), полученной и верифицированной сотрудниками Института цитологии и генетики СО РАН (Каледин и др., 2009). Клетки ГК-29 наращивали в течение 2—3 нед пассированием через мышей-самок СВА (10^6 клеток на 1 мышь).

КЛн и ЦЛн получали путем механоактивации образцов в мельнице-активаторе планетарного типа АГО-2С по описанной методике (Исупов и др., 2015). Размер частиц солей лития составляет 10 нм, его определяли под электронным микроскопом с помощью компьютерной программы Image Tool (США). В качестве препарата сравнения выбрали хлорид лития — наиболее часто используемую в экспериментальных исследованиях соль лития (Li et al., 2014).

Для выявления чувствительности клеток ГК-29 к солям лития и определения ранних структурных изменений, запускающих гибель клеток, выбрали концентрацию 5 мМ, при которой в среднем жизнеспособными остаются 50 % клеток (Гаврилова и др., 2016).

Для изучения морфологии интактные клетки ГК-29 (контроль) и клетки после 24 и 48 ч инкубации с растворами солей лития (5 мМ) фиксировали в 2.5%-ном растворе глутаральдегида (Sigma, США) на фосфатном буфере (рН 7.4). Материал дофиксировали в течение 1 ч в 1%-ном растворе OsO_4 (Sigma, США) на фосфатном буфере (рН 7.4), дегидратировали в этиловом спирте возрастающей концентрации и заключали в Эпон (Serva, Германия). Полутонкие срезы толщиной 1 мкм получали на ультрамикротоме EM UC7 (Leica, Германия/Швейцария), окрашивали толуидиновым синим и изучали под световым микроскопом LEICADME (Германия). Ультратонкие срезы толщиной 70—100 нм контрастировали насыщенным водным раствором ацетата уранила-натрия и цитратом свинца и изучали в электронном микроскопе JEM 1400. Морфометрический анализ проводили с помощью компьютерной программы Image J (Wayne Rasband, США). Вычисляли процентное содержание клеток с апоптотическими ядрами и ядерными инвагинациями, а также с двуядерных клеток после инкубации ГК-29 с солями лития в течение 48 ч.

Для определения стадий клеточного цикла клетки ГК-29 после инкубации с солями лития дважды отмывали и фиксировали в холодном 96%-ном этиловом спирте в течение 16—18 ч при 4 °С. Клетки отмывали от спирта и фиксировали с раствором пропидия иодида (100 мг/мл, BD, США) с добавлением 0.2%-ного раствора Тритона X-100 (Sigma, США) и РНКазы (0.15 мг/мл, Вектор, НСО) в течение 20 мин при 37 °С.

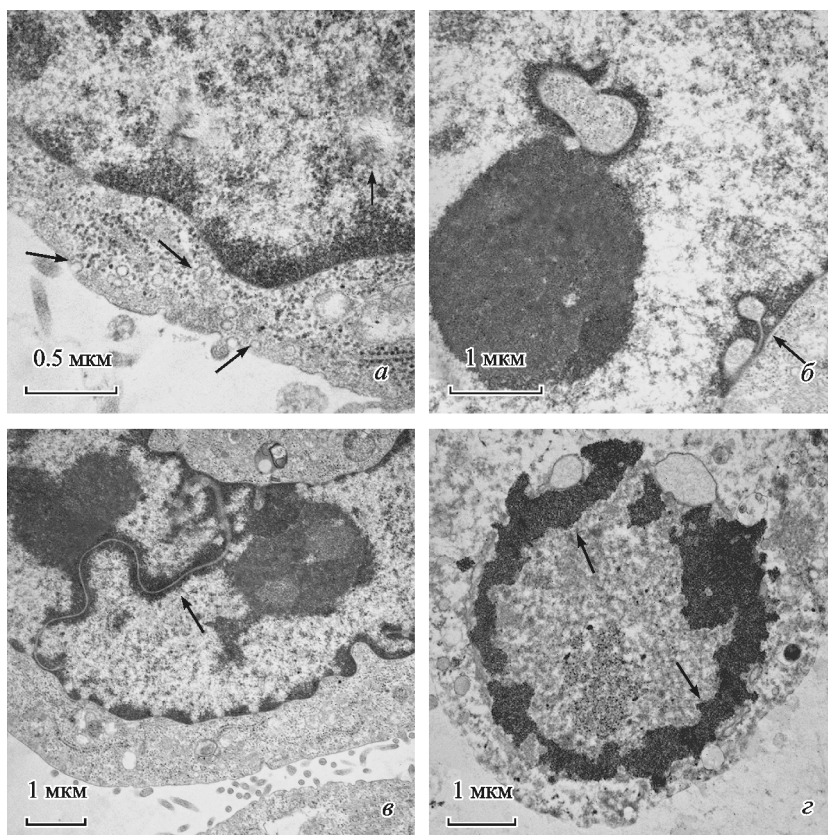


Рис. 1. Структурные изменения клеток гепатокарциномы-29 (ГК-29) через 24 ч после действия наноразмерной формы цитрата лития.

Стрелками отмечены образование эндоцитозных везикул (а), внутриядерного канала (б), формирование внутриядерного канала, пересекающего ядро (в), и конденсация хроматина в ходе апоптоза (г).

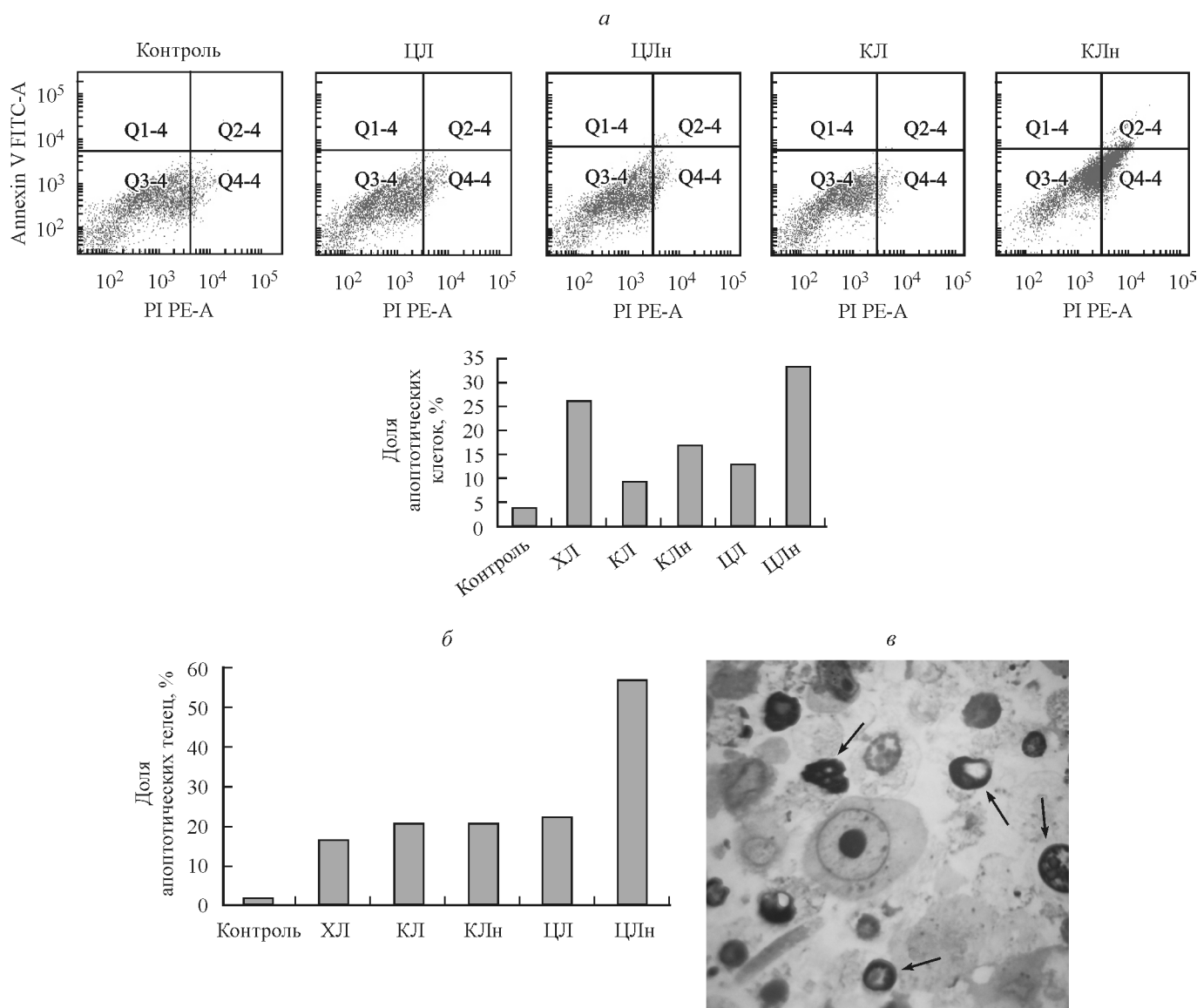


Рис. 2. Апоптоз клеток ГК-29 при их культивировании с солями лития.

a — доля клеток в стадии апоптоза через 24 ч инкубации с солями лития по данным проточной цитометрии; *б* — доля апоптотических тел в популяции ГК-29 при культивировании клеток в течение 48 ч с солями лития; *в* — апоптоз в клетках ГК-29 (стрелки) при их культивировании в течение 48 ч с наноразмерной формой цитрата лития. Окраска толуидиновым синим. 400×. Здесь и на рис. 3, 4: ГК-29 — гепатокарцинома-29, ХЛ — хлористый литий, КЛ — карбонат лития, исходная форма, КЛн — карбонат лития, наноразмерная форма, ЦЛ — цитрат лития, исходная форма, ЦЛн — цитрат лития, наноразмерная форма.

Нахождение клеток в фазах клеточного цикла исследовали на проточном цитометре FACS Canto II (BD, США).

Интенсивность реакций апоптоза клеток ГК-29 при культивировании в течение 24 ч с солями лития оценивали по связыванию клетками аннексина V с помощью набора реактивов ANNEXIN V-FITC APOPTOSIS DETECTION KIT (BD Pharmingen™, США) с использованием проточного цитометра FACS Canto II (BD, США). Результаты выражали в процентах от общего числа клеток.

Для выявления маркера аутофагии LC3B клетки ГК-29 инкубировали в течение 24 ч с солями лития, затем отмывали и добавляли первичные антитела к LC3B (Abcam, Великобритания) в разведении 1 : 400 на 1 ч при 37 °С. Отмывали и инкубировали со вторичными антителами Alexa Fluor 647 (Abcam, Великобритания) в

разведении 1 : 400 в течение 30 мин при 37 °С, осаждали, фиксировали и оценивали количество клеток, экспрессирующих маркер аутофагии, на проточном цитометре FACS Canto II (BD, США).

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Statistica 6.0. Определяли средние значения (M), стандартное отклонение (SD), медиану (Me), нижний (LQ) и верхний (UQ) квартили. Достоверность различий рассчитывали по U-критерию Манна—Уитни и принимали при значениях $p < 0.05$.

Использованные реактивы: 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромида, глутаральдегид и тетраоксид осмия (Sigma, США); Эпон (Serva, Германия); ANNEXIN V-FITC APOPTOSIS DETECTION KIT (BD Pharmingen™, США); антитела к LC3B, Alexa Fluor 647 (Abcam, Великобритания).

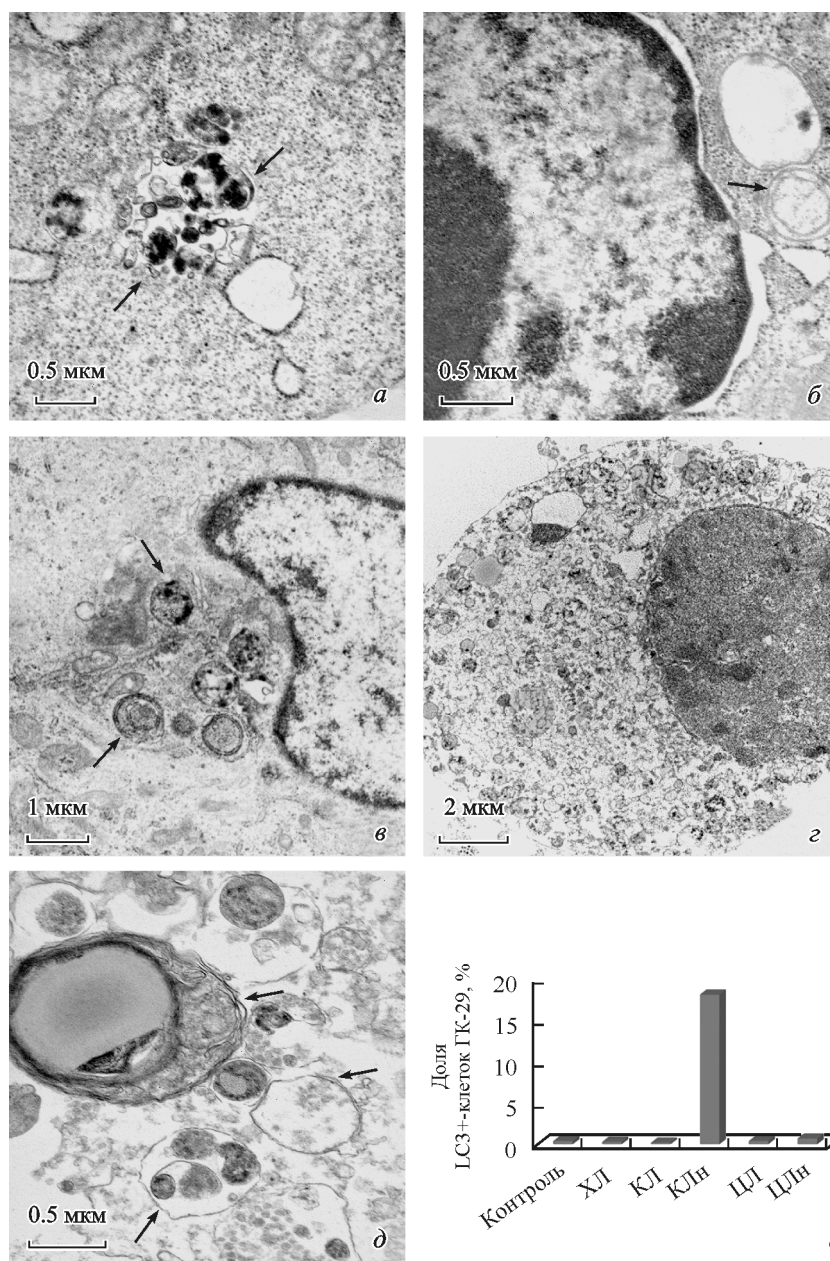


Рис. 3. Структурные изменения клеток ГК-29 при действии в течение 24 ч наноразмерной формы карбоната лития.

a — частицы карбоната лития в фагосомах клетки (*стрелки*); *б* — аутофагосома с митохондрией (*стрелка*) и расширение цистерн гранулярной эндоплазматической сети; *в* — аутофагосомы с мембранами эндоплазматической сети и лизосомы (*стрелки*); *г* — аутофаголизосомы и аутофагосомы в цитоплазме с сохранением структурной целостности ядра клетки; *д* — аутофагосомы и аутофаголизосомы в цитоплазме клетки (*стрелки*); *е* — экспрессия маркера аутофагии LC3 в клетках ГК-29.

Результаты и обсуждение

При культивировании клеток ГК-29 с солями лития наиболее выраженные структурные изменения наблюдали при действии ЦЛн. Отмечали наличие эндоцитозных везикул по периферии клеток через 24 ч инкубации (рис. 1, *a*). В ядрах клеток наблюдали инвагинации, различных локализации и размеров, расположенные по периферии ядра (рис. 1, *б*) и проходящие через весь диаметр ядер (рис. 1, *в*). Через 24 и 48 ч культивирования отмечали клетки с признаками апоптоза — наличием крупных скоплений конденсированного хроматина по периферии ядер (рис. 1, *г*).

Методом проточной цитометрии выявили наибольшее возрастание доли апоптотических клеток в популяции ГК-29 при 24 ч инкубации клеток с ЦЛн (рис. 2, *a*). Определение доли апоптотических телец при культивировании клеток ГК-29 в течение 48 ч с солями лития выявило их преобладание при воздействии ЦЛн (рис. 2, *б, в*). Тот факт, что ЦЛн в большей степени индуцирует апоптоз клеток ГК-29, чем КЛн и хлорид лития, ранее был показан при использовании солей лития в концентрации 1 мМ (Лыков и др., 2015).

При инкубации клеток ГК-29 с КЛ помимо признаков апоптоза наблюдали развитие структурных признаков аутофагии. Наиболее выраженные изменения отмечали

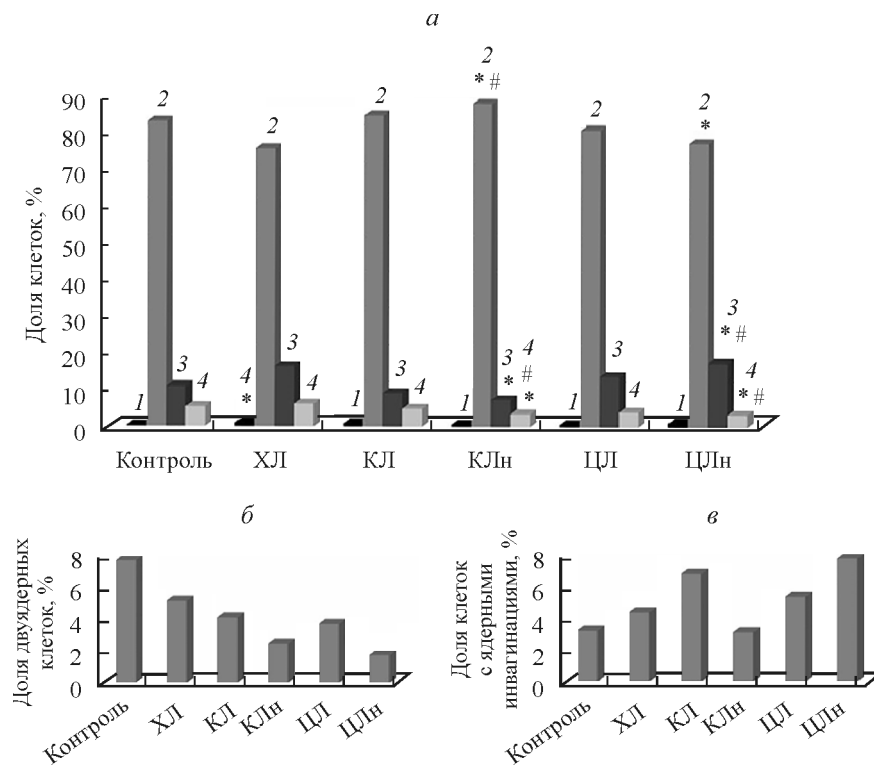


Рис. 4. Процентное соотношение клеток ГК-29 в разных стадиях клеточного цикла (а), доля двуядерных клеток (б) и доля клеток с ядерными инвагинациями (в) в популяции ГК-29 при культивировании в течение 48 ч с солями лития в концентрации 5 мМ.

1 — субG₀/G₁-фаза, 2 — G₀/G₁-фаза, 3 — S-фаза, 4 — G₂/M-фаза, * — значимость различий с контролем, # — значимость различий с наноразмерной формой соли лития, $p < 0.05$.

при воздействии КЛн. Через 24 ч после введения КЛн в цитоплазме клеток наблюдали фагосомы с частицами лития (рис. 3, а), наличие аутофагосом с митохондриями, фрагментами цитоплазмы и расширением цистерн гранулярной эндоплазматической сети (рис. 3, б), а также скопления аутофагосом с мембранами эндоплазматической сети и лизосом (рис. 3, в). Через 24 и 48 ч наблюдали клетки ГК-29 со структурными признаками аутофагической гибели, в которых при отсутствии набухания клеток и конденсации ядерного хроматина отмечали значительное содержание в цитоплазме аутофагосом и аутофаголизосом (рис. 3, г, д).

С использованием проточной цитометрии мы подтвердили развитие аутофагии в клетках ГК-29 при действии КЛн. Доля клеток ГК-29, экспрессирующих маркер аутофагии LC3, была заметно увеличена по сравнению с другими солями и формами лития ($p < 0.05$) (рис. 3, е).

Известно, что программа клеточной гибели может определяться уровнем дифференцировки и положением в клеточном цикле. В отличие от апоптоза, который может запускаться в разных фазах клеточного цикла, аутофагическая гибель развивается преимущественно в непролиферирующих клетках (G₀-фаза) и способствует их дифференцировке (Chen et al., 2016).

Распределение клеток ГК-29 по стадиям клеточного цикла выявило, что при инкубации клеток с КЛн доля клеток в фазе G₀/G₁ возрастала, а доля клеток в S-фазе клеточного цикла снижалась по сравнению с контролем и обработкой хлоридом лития ($p < 0.05$). При добавлении в среду ЦЛн, наоборот, уменьшалось процентное содержание клеток в фазе G₀/G₁ и увеличивалась доля клеток в S-фазе клеточного цикла по сравнению с контро-

лем ($p < 0.05$) (рис. 4, а). Тот факт, что КЛн в большей степени задерживает клетки ГК-29 в фазе G₀/G₁, по-видимому, в данном случае может являться структурной основой развития аутофагии в дифференцирующихся клетках.

Кроме того, выявлено, что ЦЛ и КЛн снижают процентное содержание клеток ГК-29, находящихся в G₂/M-фазе клеточного цикла, что согласуется с данными литературы о подавлении пролиферации клеток и аресте клеточного цикла в G₂/M-фазе при применении лития (Tsui et al., 2012).

Большую гибель клеток, исходя из данных об апоптозе клеток ГК-29 (рис. 2, а), отмечали при действии ЦЛн. Подтверждением его действия преимущественно на пролиферирующие клетки является значительное снижение доли двуядерных клеток в популяции ГК-29 (рис. 4, б). При этом возрастание доли клеток с ядерными инвагинациями (рис. 4, в) свидетельствует о большей частоте патологических форм деления (Vargas et al., 2012) при воздействии ЦЛн.

Литий является принятым препаратом для лечения биполярного расстройства (Malhi et al., 2012). Исследования свойств соединений лития при различных патологиях выявили разнообразие результатов его действия на биологические объекты (Mota de Freitas et al., 2016). С одной стороны, имеются многочисленные исследования, свидетельствующие об индукции апоптоза в различных типах опухолевых клеток при использовании солей лития, при этом преимущественно изучается влияние хлористого лития (Li et al., 2014). Основным механизмом запуска апоптоза при действии солей лития объясняется ингибированием ГСК-3β и Akt пути (Li et al., 2015).

С другой стороны, появляются работы, отражающие развитие процессов аутофагии в клетках при применении лития (Motoi et al., 2014). Структурные признаки развития аутофагии показаны при введении солей лития в клеточную культуру мотонейронов куриных эмбрионов — накопление больших плотных пузырьков и аутофагических вакуолей, нейрофиламентов, нарушение структуры шероховатой эндоплазматической сети, уменьшение свободных рибосом (Calderó et al., 2010). Выявлено, что литий влияет на образование аутофагосом в нейронах при нейродегенеративном заболевании (Chang et al., 2011). Отмечено развитие аутофагии при введении лития в культуру раковых клеток пищевода и карциномы толстой кишки (O'Donovan et al., 2015).

Механизм развития аутофагии при действии лития связывают со способностью лития ингибировать активность инозитол монофосфатазы (ИМФ) и впоследствии снижать уровень инозитол 1,4,5-трифосфата (Sarkar et al., 2005). Считается, что аутофагия играет двойственную роль в функционировании раковых клеток, с одной стороны, являясь механизмом выживания, с другой — способствуя их гибели (Peng et al., 2013; Zhang et al., 2016). Предполагается, что усиление аутофагической гибели опухолевых клеток, устойчивых к апоптотической смерти, может помочь достичь лучшей терапевтической эффективности противоопухолевых препаратов (O'Donovan et al., 2015).

Ингибирование литием двух основных его внутриклеточных мишеней — ГСК-3 β и ИМФ — оказывает противоположное влияние на развитие клеточной гибели, обуславливая индукцию апоптоза или аутофагии. Предполагается, что данное влияние модулируется дозой лития. При более низких дозах литий ингибирует ИМФ и вызывает развитие аутофагии. Более высокие дозы лития подавляют активность ГСК-3 β и запускают процесс апоптоза (Dell'Osso et al., 2016). Кроме того, отмечено, что литий, действуя посредством различных механизмов, может активировать или подавлять аутофагию в зависимости от условия введения и типов клеток (Fabrizi et al., 2012). Для понимания механизмов, лежащих в основе индукции аутофагии или апоптоза в клетках ГК при действии ЦЛн и КЛн, необходимы дальнейшие исследования.

Результаты настоящей работы свидетельствуют о том, что действие солей лития приводит к развитию структурных признаков, приводящих к гибели клетки ГК-29. Более выраженное влияние на клетки ГК-29 оказывают ЦЛн и КЛн. При этом ЦЛн преимущественно индуцирует апоптоз, а КЛн наряду с апоптозом — аутофагическую гибель клеток ГК-29.

Список литературы

Бгатовая Н. П., Омелянчук Л. В., Пожидаева А. А., Семешин В. В., 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 противоопухолевых средств. Бюл. эксперим. биол. и мед. 160 (7) : 126—132. (Bgatova N. P., Omeliyanchuk L. V., Pozhidaeva A. A., Semeshin V. V., Lykov A. P., Poveschenko O. V., Makarova O. P., Pachkovskaya L. N., Borodin Yu. I., Konenkov V. I. 2015. Morphological criteria stages of cell differentiation experimental hepatocarcinoma for evaluating anticancer agents. Bull. Exp. Biol. Med. 160 (7) : 126—132.)

Гаврилова Ю. С., Бгатовая Н. П., Соловьева А. О., Трифонова К. Э., Лыков А. П., Бородин Ю. И., Коненков В. И. 2016.

Клетки-мишени различных форм лития в гетерогенной популяции гепатокарциномы-29. Цитология. 58 (3) : 186—191. (Gavrilova Yu. S., Bgatova N. P., Solov'eva A. O., Trifonova K. E., Lykov A. P., Borodin Yu. I., Konenkov V. I. 2016. Target cells for lithium in different forms within a heterogeneous hepatocarcinoma-29 population. Tsitologiya. 58 (3) : 186—191.)

Исупов В. П., Булина Н. В., Еремин Н. В. 2015. Структурные и дисперсные характеристики карбоната лития после механической активации и термической обработки. Неорганические материалы. 51 (4) : 1—7. (Isupov V. P., Bulina N. V., Eremin N. V. 2015. Structural and disperse characteristics of a carbonate of lithium after mechanical activation and thermal processing. Inorganic materials. 51 (4) : 1—7.)

Каледин В. И., Жукова Н. А., Николин В. П., Попова Н. А., Беляев М. Д., Багинская Н. В., Литвинова Е. А., Толстикова Т. Г., Лушикова Е. Л., Семенов Д. Е. 2009. Гепатокарцинома-29 — метастазирующая перевиваемая опухоль мышей, вызывающая кахексию. Бюл. эксперим. биол. мед. 148 (12) : 664—669. (Kaledin V. I., Zhukova N. A., Nikolin V. P., Popova N. A., Belyaev M. D., Baginskaya N. B., Litvinova E. A., Tolstikova T. G., Lushnikova E. L., Semenov D. E. 2009. Hepatocellular carcinoma-29 — metastatic transplantable tumor of mice, causing cachexia. Bul. Exp. Biol. Med. 148 (12) : 664—669.)

Лыков А. П., Повещенко О. В., Бгатовая Н. П., Макарова О. П., Коненков В. И. 2015. Антипролиферативный потенциал официальных форм и наноразмерных частиц солей лития. Бюл. эксперим. биол. мед. 160 (12) : 802—805. (Lykov A. P., Poveschenko O. V., Bondarenko N. A., Bgatova N. P., Makarova O. P., Konenkov V. I. 2015. Antiproliferative potential of official forms and nanoparticals of lithium salts. Bull. Exp. Biol. Med. 160 (12) : 802—805.)

Calderó J., Brunet N., Tarabal O., Piedrafita L., Hereu M., Ayala V., Esquerda J. E. 2010. Lithium prevents excitotoxic cell death of motoneurons in organotypic slice cultures of spinal cord. Neuroscience. 165 : 1353—1369.

Chang J. W., Choi H., Cotman S. L., Jung Y. K. 2011. Lithium rescues the impaired autophagy process in CbCln3(Dex7/8/Dex7/8) cerebellar cells and reduces neuronal vulnerability to cell death via IMPase inhibition. J. Neurochem. 116 : 659—668.

Chen Y. J., Fang L. W., Su W. C., Hsu W. Y., Yang K. C., Huang H. L. 2016. Lapatinib induces autophagic cell death and differentiation in acute myeloblastic leukemia. Onco Targets Ther. 9 : 4453—4464.

Chiu C. T., Wang Z., Hunsberger J. G., Chuang D. M. 2013. Therapeutic potential of mood stabilizers lithium and valproic acid: beyond bipolar disorder. Pharmacol. Rev. 65 : 105—142.

Cui J., Gong Z., Shen H.M. 2013. The role of autophagy in liver cancer: molecular mechanisms and potential therapeutic targets. Biochim. biophys. acta. 1836 : 15—26.

De Araujo W. M., Robbs B. K., Bastos L., de Souza W. F., Vidal-Cabral F., Viola J. P., Morgado-Diaz J. A. 2015. PTEN overexpression cooperates with lithium to reduce the malignancy and to increase cell death by apoptosis via PI3K/Akt suppression in colorectal cancer cells. J. Cell. Biochem. Doi: 10.1002/jcb.25294.

Degterev A., Yuan J. 2008. Expansion and evolution of cell death programs. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 9 : 378—390.

Dell'Osso L., Del Grande C., Gesi C., Carmassi C., Musetti L. 2016. A new look at an old drug: neuroprotective effects and therapeutic potentials of lithium salts. Neuropsychiatr. Dis. Treat. 12 : 1687—1703.

Edinger A. L., Thompson C. B. 2004. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. Curr. Opin. Cell Biol. 16 : 663—669.

Erdal E., Ozturk N., Cagatay T., Eksioğlu-Demiralp E., Ozturk M. 2005. Lithium-mediated downregulation of PKB/Akt and cyclin E with growth inhibition in hepatocellular carcinoma cells. Int. J. Cancer. 115 : 903—910.

Fabrizi C., Somma F., Pompili E., Biagioni F., Lenzi P., Fornai F., Fumagalli L. 2012. Role of autophagy inhibitors and inducers in modulating the toxicity of trimethyltin in neuronal cell cultures. J. Neural. Transm. (Vienna). 119 : 1295—1305.

Gomperts B., Walser T. C., Spira A., Dubinett S. M. 2013. Enriching the molecular definition of the airway «field of canceriza-

tion»: establishing new paradigms for the patient at risk for lung cancer. *Cancer Prev. Res. (Phila)*. 6 : 4—7.

Li H., Huang K., Liu X., Liu J., Lu X., Tao K., Wang G., Wang J. 2014. Lithium chloride suppresses colorectal cancer cell survival and proliferation through ROS/GSK-3 β /NF- κ B signaling pathway. *Oxid. Med. Cell Longev*. Doi : 10.1155/2014/241864.

Li L., Song H., Zhong L., Yang R., Yang X. Q., Jiang K. L., Liu B. Z. 2015. Lithium chloride promotes apoptosis in human leukemia NB4 cells by inhibiting glycogen synthase kinase-3 beta. *Int. J. Med. Sci.* 12 : 805—810.

Malhi G. S., Tanius M., Das P., Berk M. 2012. The science and practice of lithium therapy. *Aust. N. Z. J. Psychiatry* 46 : 192—211.

McCubrey J. A., Rakus D., Gizak A., Steelman L. S., Abrams S. L., Lertpiriyapong K., Fitzgerald T. L., Yang L. V., Montalto G., Cervello M., Libra M., Nicoletti F., Scalisi A., Torino F., Fenga C., Neri L. M., Marmioli S., Cocco L., Martelli A. M. 2016. Effects of mutations in Wnt/ β -catenin, hedgehog, Notch and PI3K pathways on GSK-3 activity—Diverse effects on cell growth, metabolism and cancer. *Biochim. biophys. acta.* 1863 : 2942—2976.

Mota de Freitas D., Leversson B. D., Goossens J. L. 2016. Lithium in medicine: mechanisms of action. *Met. Ions Life Sci.* 16 : 557—584.

Motoi Y., Shimada K., Ishiguro K., Hattori N. 2014. Lithium and autophagy. *ACS Chem. Neurosci.* 5 : 434—442.

O'Donovan T. R., Rajendran S., O'Reilly S., O'Sullivan G. C., McKenna S. L. 2015. Lithium modulates autophagy in esophageal and colorectal cancer cells and enhances the efficacy of therapeutic agents *in vitro* and *in vivo*. *PLoS ONE*. 10 : e0134676. Doi : 10.1371/journal.pone.0134676.

Peng Y. F., Shi Y. H., Shen Y. H., Ding Z. B., Ke A. W., Zhou J., Qiu S. J., Fan J. 2013. Promoting colonization in metastatic HCC cells by modulation of autophagy. *PLoS ONE*. 8 : e74407. Doi : 10.1371/journal.pone.0074407.

Quiroz J. A., Gould T. D., Manji H. K. 2004. Molecular effects of lithium. *Mol. Interv.* 4 : 259—272.

Sarkar S., Floto R. A., Berger Z., Imarisio S., Cordenier A., Pasco M., Cook L. J., Rubinsztein D. C. 2005. Lithium induces autophagy by inhibiting inositol monophosphatase. *J. Cell Biol.* 170 : 1101—1111.

Shen Y., Cao D. 2012. Hepatocellular carcinoma stem cells: origins and roles in hepatocarcinogenesis and disease progression. *Front. Biosci.* 1 : 1157—1169.

Tsui M. M., Tai W. C., Wong W. Y., Hsiao W. L. 2012. Selective G₂/M arrest in a p53 (Val135)-transformed cell line induced by lithium is mediated through an intricate network of MAPK and β -catenin signaling pathways. *Life Sci.* 24 : 312—321.

Vargas J. D., Hatch E. M., Anderson D. J., Hetzer M. W. 2012. Transient nuclear envelope rupturing during interphase in human cancer cells. *Nucleus*. 3 : 88—100.

Wang J. S., Wang C. L., Wen J. F., Wang Y. J., Hu Y. B., Ren H. Z. 2008. Lithium inhibits proliferation of human esophageal cancer cell line Eca-109 by inducing a G₂/M cell cycle arrest. *World J. Gastroenterol.* 7 : 3982—3989.

Zhang C., Jia X., Wang K., Bao J., Li P., Chen M., Wan J. B., Su H., Mei Z., He C. 2016. Polyphyllin VII induces an autophagic cell death by activation of the JNK pathway and inhibition of PI3K/AKT/mTOR pathway in HepG2 cells. *PLoS ONE*. 11 : e0147405. Doi : 10.1371/journal.pone.0147405.

Поступила 12 X 2016

APOPTOSIS AND AUTOPHAGY IN HEPATOCARCINOMA CELLS INDUCED BY DIFFERENT FORMS OF LITHIUM SALTS

N. P. Bgatova,¹ Yu. S. Gavrilova, A. P. Lykov, A. O. Solovieva, V. V. Makarova, Yu. I. Borodin, V. I. Konenkov

Scientific Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Novosibirsk, 630060;

¹ e-mail: bgatova@ngs.ru

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the aggressive and resistant to drug therapy cancer. It is believed that the development of HCC is correlated with dysregulation of programmed cell death. So, the search for effective inducers of HCC cell death is very important. The aim of the work was to identify structural changes leading to HCC cell death when exposed to nanoscale and original forms of lithium salts. Using light and electron microscopy and flow cytometry, structural features of autophagy and apoptosis in HCC cells after their incubation with various forms of lithium salts has been revealed. It is shown that a more pronounced effect on HCC-29 cells have nanoscale forms of lithium carbonate and lithium citrate. At the same time, nanoscale lithium citrate mainly induced apoptosis, and nanosized form of lithium carbonate, along with apoptosis, induced autophagic death of HCC-29 cells.

Key words: lithium carbonate, lithium citrate, nanoscale forms of lithium carbonate and lithium citrate, hepatocarcinoma-29, apoptosis, autophagy.