

DOI: 10.7868/S0041377118090059

ЭНТОЗ И КЛЕТОЧНЫЙ ЦИКЛ В КУЛЬТУРЕ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

© *О. П. Кисурин-Евгеньева,* Л. А. Хаиба, М. А. Савицкая, Г. Е. Онищенко*

*Кафедра клеточной биологии и гистологии биологического факультета
Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, Москва, 119991;*

** электронный адрес: evgengeva@mail.ru*

Энтоз представляет собой один из вариантов клеточного каннибализма, при котором одна опухолевая клетка внедряется в другую. Внедрившаяся клетка может покинуть энтозную вакуоль, вступить в митоз или подвергнуться лизосомно-опосредованной деградации. Целью данной работы было выяснить, способны ли клетки аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 (p53+) и эпидермоидной карциномы человека A431 (p53-) в процессе энтоза продвигаться по клеточному циклу. Частота встречаемости энтозов составляет $1.01 \pm 0.37\%$ для MCF-7 и $0.42 \pm 0.27\%$ для A431. Исследования показали, что и энтозная, и внедрившаяся клетки в обеих культурах способны реплицировать ДНК (импульсное включение BrdU) и вступать в митотическое деление, т. е. продвигаться по клеточному циклу. Процесс деградации внедрившейся клетки нарушает вступление в S-фазу энтозных клеток культуры MCF-7 (p53+). Морфометрический анализ показал, что в процессе энтоза может происходить полиплоидизация энтозных клеток в культуре. Наиболее выражен этот процесс в культуре клеток A431 (p53-). Кроме того, полиплоидные клетки могут являться предпочтительными мишенями внедрения в данной культуре. В культуре клеток MCF-7 повышена доля энтозных клеток в G₁-фазе, что может быть обусловлено остановкой в продвижении по клеточному циклу, опосредованной p53, либо предпочтительным внедрением в клетки G₁-фазы. В целом можно предположить, что в опухолях, клетки которых экспрессируют белок p53 дикого типа, энтоз способен вносить вклад в полиплоидизацию и генетическую нестабильность опухолевых клеток в меньшей степени по сравнению с p53-опухолевыми клетками.

Ключевые слова: энтоз, клеточный цикл, p53

Энтоз представляет собой один из вариантов клеточного каннибализма, при котором одна опухолевая клетка внедряется в другую (Overholtzer et al., 2007; Sharma, Dey, 2011; Yang, Li, 2012; Durgan, Florey, 2018). Наличие картин «клетка-в-клетке» коррелирует со степенью злокачественности опухоли и неблагоприятным прогнозом противопухолевой терапии (Fais, 2007; Sharma, Dey, 2011). Механизм энтоза в настоящее время активно исследуется. Показано, что внедрение предварительно открепившихся клеток представляет собой активный процесс, который требует работы актомиозиновой системы и сопровождается образованием адгезивных контактов между клетками (Overholtzer et al., 2007). В прикрепленных клеточных культурах внедряющаяся клетка взаимодействует с будущей энтозной (наружной) клеткой, формируя «кратер» на ее поверхности. Энтозная клетка образует протрузию плазматической мембраны, закрывая внедряющуюся клетку (Garanina et al., 2017). Между клетками устанавливаются адгезивные контакты. Внедрившаяся клетка некоторое время сохраняет свою жизнеспособность. Затем такая клетка чаще всего подвергается лизосомно-опосредованной деградации. В зависимости от степени деградации процесс энтоза можно разделить на 5 стадий (Garanina et al., 2017). На первой стадии обе клетки соеди-

нены адгезивными контактами и свободное пространство энтозной вакуоли не выявляется. Ядро внедрившейся клетки не имеет признаков деградации. На второй стадии частично разрушаются адгезивные контакты между клетками. Третья стадия характеризуется полной потерей контактов, появлением выраженного свободного пространства энтозной вакуоли и появлением признаков деградации ядра внедрившейся клетки. На четвертой стадии значительно уменьшается размер внедрившейся клетки и продолжается деградация ее ядра. На пятой стадии хроматин внедрившейся клетки не выявляется. Помимо деградации описаны случаи митотического деления и выхода внедрившейся клетки из вакуоли (Overholtzer et al., 2007; Overholtzer, Brugge, 2008). Энтозная клетка также способна вступать в митотическое деление. При этом энтозная вакуоль создает механические препятствия для формирования контрактильного кольца (Krajcovic et al., 2011), в результате образуется полиплоидная клетка.

Таким образом, энтоз оказывает двойное влияние на опухолевую прогрессию: с одной стороны, в процессе энтоза происходит гибель опухолевых клеток; с другой стороны, полиплоидизация энтозных клеток, наоборот, способствует повышению генетической нестабильности.

Активные исследования энтоза, проводимые в последние годы, почти не затрагивают проблему взаимосвязи данных процессов с клеточным циклом. Неизвестно, каким образом регулируется прохождение по клеточному циклу у энтозных и внедрившихся клеток, в каких фазах клеточного цикла может происходить внедрение одной клетки в другую, существует ли блок митоза или удлинение прохождения какой-либо фазы клеточного цикла энтозной и внедрившейся клеток. Ответы на эти вопросы позволят лучше понять физиологию энтозных клеток и оценить вклад энтоза в прогрессию опухолевого роста.

В настоящей работе в качестве моделей для исследования использовали клетки аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 (p53+) и эпидермоидной карциномы человека A431 (p53-), в которых ген *p53* имеет мутацию, изменяющую транскрипционную активность белка (Reiss et al., 1992). Используемый подход позволил оценить способность энтозных и внедряющихся клеток к прохождению разных фаз клеточного цикла и полиплоидизации в зависимости от наличия ключевого регулятора клеточного цикла белка p53.

Материал и методика

Клетки культуры MCF-7 (аденокарцинома молочной железы) были получены из НИИ канцерогенеза Российского онкологического научного центра им. Н. Н. Блохина. Клетки культуры A431 (эпидермоидная карцинома человека) были получены из Российской коллекции клеточных культур позвоночных (РККК П) (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). Клетки выращивали в средах DMEM (ПанЭко, Россия) (A431) и RPMI 1640 (ПанЭко, Россия) (MCF-7) с добавлением 10 % фетальной сыворотки крупного рогатого скота (РАА Laboratories, Австрия) и 80 мг/мл гентамицина (ПанЭко, Россия) при 37 °C и 5 % CO₂.

Для морфологического анализа клетки фиксировали 96%-ным этанолом (при -20 °C) и окрашивали гематоксилином и эозином по стандартной методике. На полученных препаратах подсчитывали энтотический и митотический индексы ($n = 3000$). Для оценки плоидности клеток на этих же препаратах проводили измерения (ПО Vision Bio® Analyze, Россия) проекционной площади ядер (неэнтозных клеток, энтозных клеток и внедрившихся клеток) и энтозной вакуоли. При наличии нескольких ядер или микроядер их проекционные площади суммировали. Для построения гистограмм использовали программу Microsoft Excel 2003. Поскольку энтоз представляет собой редкое явление, при статистической обработке данных, полученных при исследовании энтозных клеток, стандартное отклонение не определяли; при этом указывали число проанализированных энтозов.

Для выявления способности клеток, заблокированных в одной из фаз клеточного цикла (на границе G₁/S-фаз), вступать в энтоз клетки инкубировали в присутствии гидроксимочевины (SERVA, США) (4 mM, 24 ч).

Для выявления клеток, находящихся в S-фазе клеточного цикла, использовали метод импульсного мечения 5-бром-2'-дезоксисуридином (BrdU) (Boehringer Mannheim GmbH, Германия) (10 мин, 10 мкМ). Затем клетки фиксировали 4%-ным формальдегидом (MP Biochemicals, Франция), приготовленным на 0.1 M буфере PBS (Sigma, США), pH 7.2, обрабатывали 4 N HCl и окрашивали с помощью моноклональных антител мыши против BrdU

(Sigma, США). Подсчет индекса мечения в популяции проводили на 3000 клеток. Локализацию белка p53 выявляли с помощью моноклональных антител мыши (Sigma, США). В качестве вторых антител использовали антитела против Ig мыши, конъюгированные с Alexa Fluor-488 (Sigma, США). Ядра клеток докрашивали DAPI (0.1 мкг/мл) (Sigma, США).

Препараты анализировали с помощью люминесцентного микроскопа Axiovert 200M (Carl Zeiss Inc., Германия). Цифровые изображения обрабатывали с помощью программ Adobe Photoshop и ImageJ.

Результаты

Морфологическое описание энтозов в клетках культуры MCF-7 и A431. Энтоз является достаточно редким событием в популяции клеток аденокарциномы молочной железы MCF-7 и эпидермоидной карциномы A431.

Анализ препаратов на светооптическом уровне позволил выявить разные варианты энтозных и внедрившихся клеток в обеих исследованных культурах (рис. 1; см. таблицу). Встречались одноядерные, двуядерные и микроядерные энтозные клетки. В культуре клеток MCF-7 из 94 энтозных клеток 14 содержали 2 ядра, в культуре A431 из 71 энтозной клетки двуядерными являлись 15. В составе энтозной вакуоли могли присутствовать одиночные внедрившиеся клетки, 2 внедрившиеся клетки и двуядерные клетки, находящиеся на разных стадиях деградации. Случаи, когда внутри энтозной вакуоли присутствовали 2 клетки, составляли около 10 % (в культуре MCF-7 — 19 из 200 энтозов, в культуре A431 — 27 из 200 энтозов). При этом в культуре MCF-7 примерно 50 % таких клеток находились на 4—5-стадиях энтоза и имели явные признаки деградации (9 клеток из 19), а в культуре A431 лишь 25 % клеток (7 из 27) имели признаки деградации.

В обеих культурах были обнаружены митотические энтозные клетки (рис. 2; см. таблицу). Также были выявлены клетки, в которых митоз претерпевает внедрившаяся клетка (рис. 3). Подсчет митотических клеток на светооптическом уровне показал, что по сравнению с культурой MCF-7 клетки культуры A431 характеризуются более высоким митотическим индексом (МИ). При этом в отличие от MCF-7 в культуре A431 и энтозные, и внедрившиеся клетки значительно реже вступают в деление (см. таблицу).

Также в обеих культурах встречались клетки, находящиеся в поздней телофазе, которые формировали «кратер» в интерфазных клетках (рис. 4). Формирование кратера представляет собой начальный этап внедрения (Garanina et al., 2017). В интерфазных клетках бобовидное ядро было смещено на периферию, что является характерной чертой энтозных клеток (рис. 4, а—в). Клетки на стадии поздней телофазы находились в процессе конденсации хромосом (ядрышки не выявлялись), их плазматическая мембрана формировала многочисленные сферические выпячивания. Клетки оставались соединенными остаточным тельцем (рис. 4, а'—в'). Сестринские клетки могли формировать кратер в 1 интерфазной клетке, в 2 разных интерфазных клетках или 1 из дочерних клеток могла прикрепляться к подложке.

Энтозная и внедрившаяся клетки способны к репликации ДНК. В литературе имеются от-

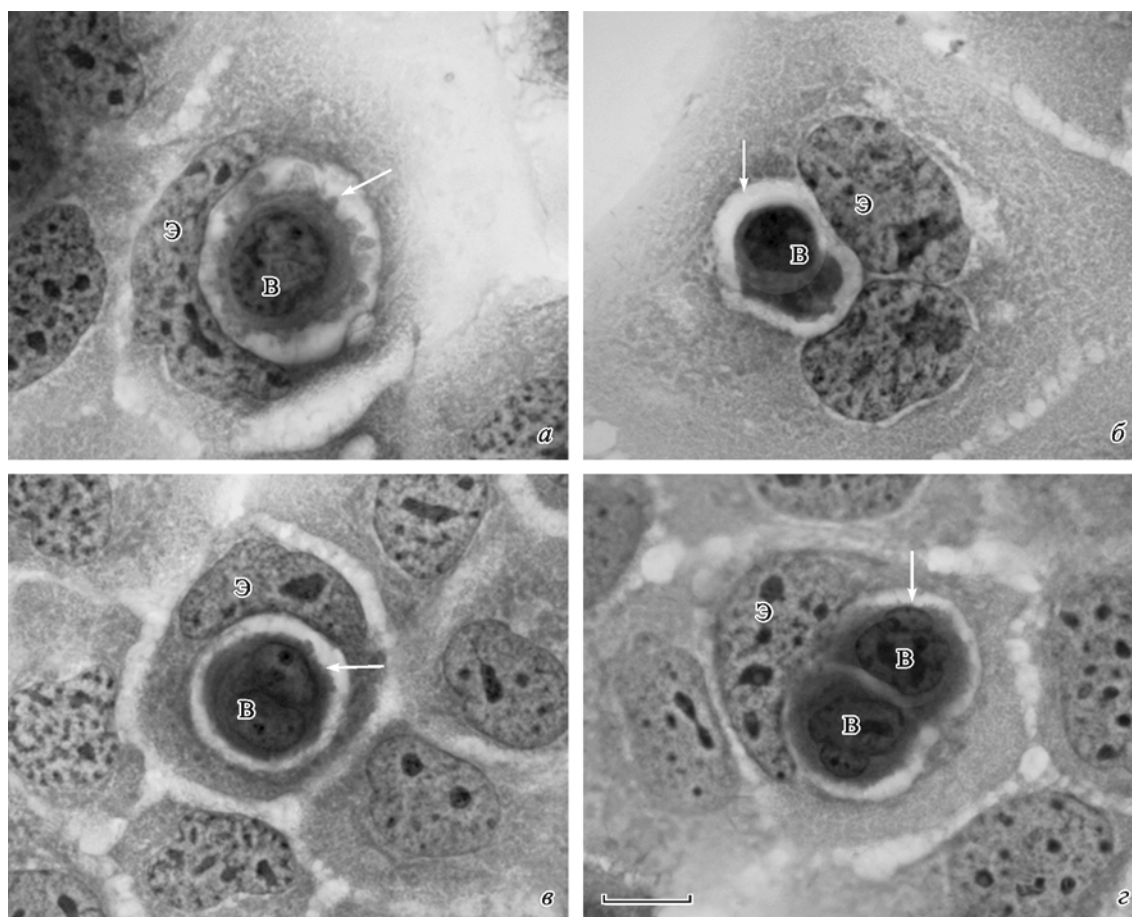


Рис. 1. Энтозы в клетках культуры А431. Световая микроскопия, окрашивание гематоксилином и эозином.

а — одноядерная энтозная и внедряющаяся клетки (3-я стадия); *б* — двуядерная энтозная клетка и деградирующая внедряющаяся клетка (4-я стадия); *в* — одноядерная энтозная клетка и двуядерная внедряющаяся клетка (2-я стадия); *г* — одноядерная энтозная клетка и две внедрившиеся клетки с микроядрами (2-я стадия). Э — энтозная клетка, В — внедряющаяся клетка, стрелка указывает на энтозную вакуоль. Масштабный отрезок — 10 мкм.

рывочные данные о включении ^3H -тимидина в структуры «клетка-в-клетке» (Brouwer et al., 1984). Поэтому для оценки способности энтозных и внедрившихся клеток продвигаться по клеточному циклу были проведены эксперименты по импульсному включению BrdU клетками в S-фазе.

В культуре клеток MCF-7 индекс мечения составлял $30 \pm 2.4\%$, в культуре А431 — $35 \pm 5\%$. Анализ включения метки BrdU показал, что к синтезу ДНК способны как энтозные, так и внедрившиеся клетки (рис. 5, *а–г*). При этом репликация могла проходить одновременно и в энтозной, и во внедрившейся клетках, только в энтозной клетке, только во внедрившейся клетке.

В клетках культуры MCF-7 (рис. 5, *д*) более 50% энтозов являлись немечеными, т. е. ни энтозная, ни вне-

дряющаяся клетки не реплицировали ДНК. В S-фазе клеточного цикла находились 29% энтозных клеток, что практически совпадало с индексом мечения в популяции ($30 \pm 2.4\%$). При этом из 40 энтозных клеток на 1–3-й стадиях энтоза 26 клеток находились в S-фазе. Из 13 энтозных клеток на 4–5-й стадиях только 4 клетки включали метку. Таким образом, в культуре клеток MCF-7 процесс деградации внедрившейся клетки может влиять на вступление энтозных клеток в S-фазу.

В клетках культуры А431 (рис. 5, *д*) в отличие от культуры MCF-7 преобладали энтозы, в которых энтозная клетка реплицирует ДНК (55%), что превышает индекс мечения в популяции ($35 \pm 5\%$).

Индекс мечения среди внедрившихся клеток несколько ниже индекса мечения в популяции в обеих культурах

Морфологические характеристики энтозных клеток линий MCF-7 и А431

Клетки	ЭИ, %, n = 3000	Двуядерные энтозные клетки, %, n = 200	Две клетки в составе одной вакуоли, %, n = 200	МИ, %, n = 3000	МИ-Э, %, n = 200	МИ-В, %, n = 200
MCF-7	1.01 ± 0.37	14.8	9.5	3.2 ± 0.5	5	3.5
A431	0.42 ± 0.27	21.1	13.5	8.2 ± 1.8	1.0	2.0

Примечание. ЭИ — энтотический индекс в популяции, МИ — митотический индекс в популяции, МИ-Э — митотический индекс энтозных клеток, МИ-В — митотический индекс внедрившихся клеток.

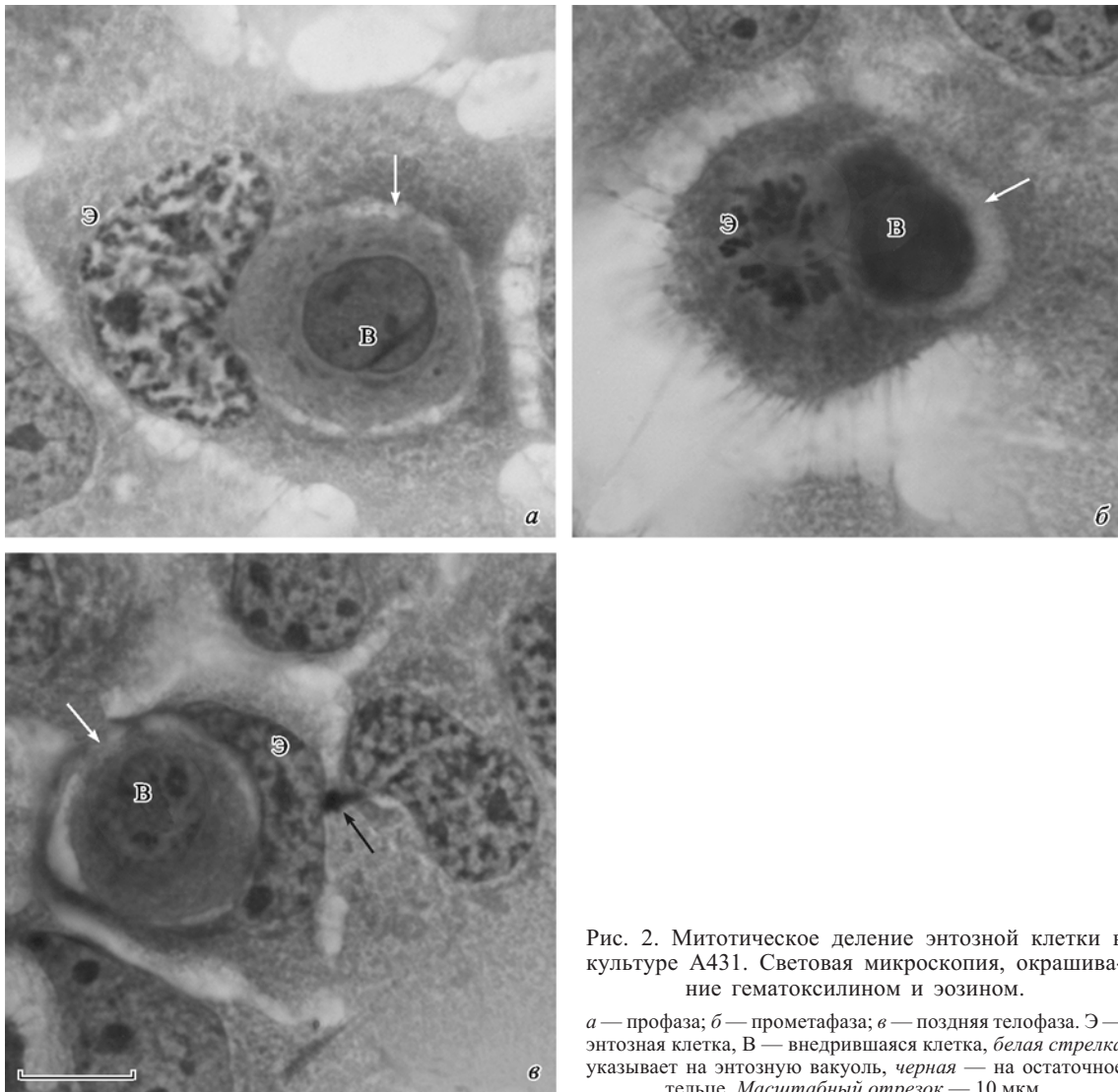


Рис. 2. Митотическое деление энтозной клетки в культуре А431. Световая микроскопия, окрашивание гематоксилином и эозином.

а — профаза; б — прометафаза; в — поздняя телофаза. Э — энтозная клетка, В — внедряющаяся клетка, белая стрелка указывает на энтозную вакуоль, черная — на остаточное тельце. Масштабный отрезок — 10 мкм.

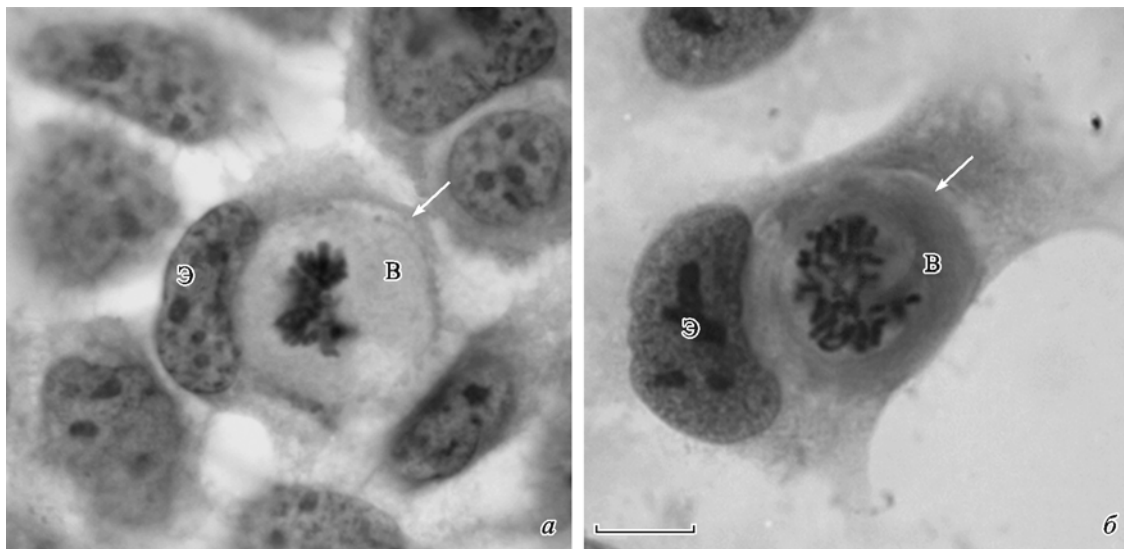


Рис. 3. Митотическое деление внедряющихся клеток. Световая микроскопия, окрашивание гематоксилином и эозином. а — культура клеток А431; б — культура клеток МСF-7. Э — энтозная клетка, В — внедряющаяся клетка, стрелка указывает на энтозную вакуоль. Масштабный отрезок — 10 мкм.

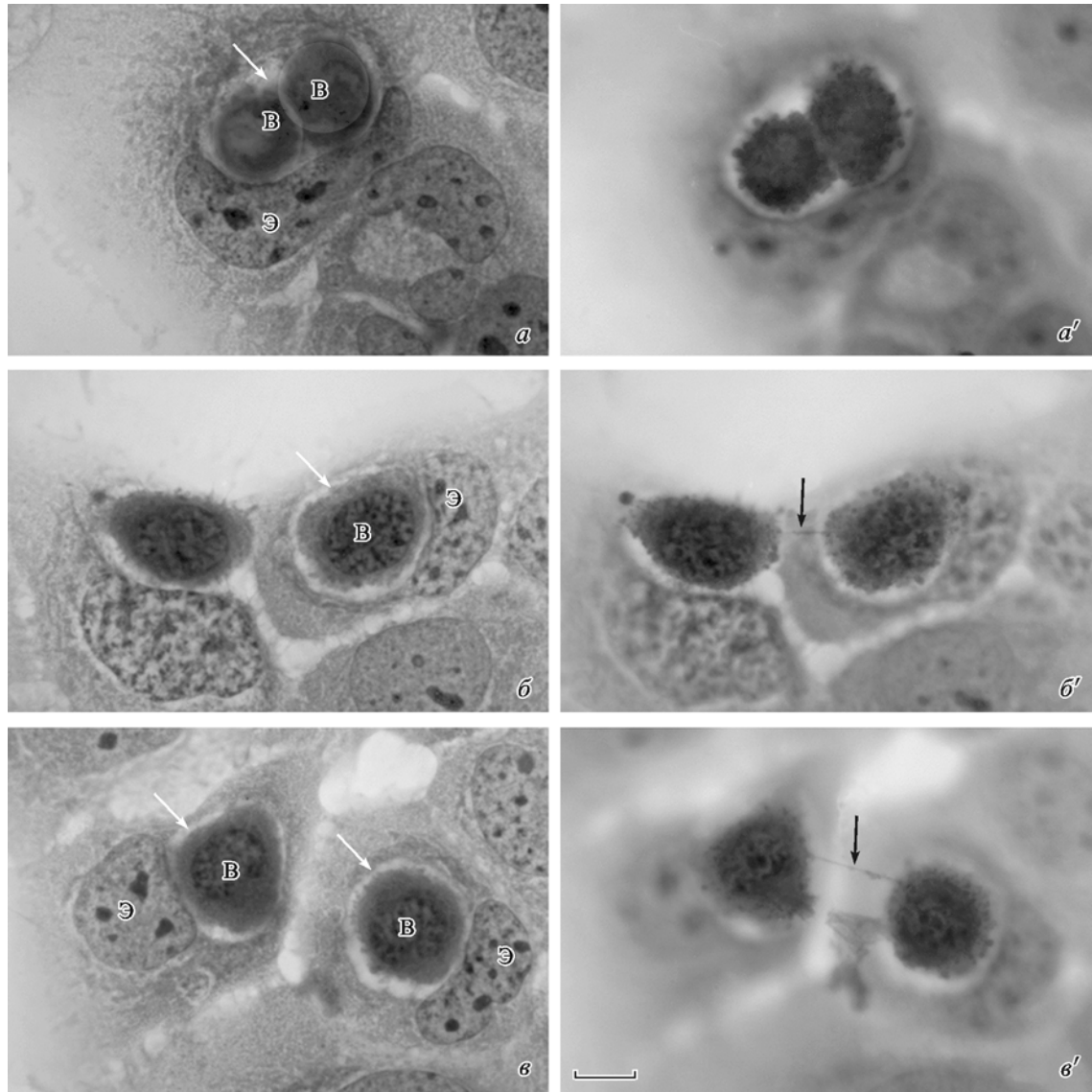


Рис. 4. Начальные этапы внедрения клеток в культуре А431 на стадии поздней телофазы. Световая микроскопия, окрашивание гематоксилином и эозином.

a—c — нижние оптические срезы; *a'—c'* — верхние оптические срезы тех же клеток. *a, a'* — сестринские клетки формируют кратер в одной интерфазной клетке, их мембраны формируют многочисленные выпячивания мембраны; *b, b'* — одна из сестринских клеток формирует кратер в интерфазной клетке, другая прикреплена к подложке, *стрелка* указывает на остаточное тельце; *c, c'* — сестринские клетки формируют кратеры в соседних интерфазных клетках, *стрелка* указывает на остаточное тельце.

(23 % для MCF-7 и 25 % для A431) (рис. 5). Большинство внедрившихся клеток, реплицирующих ДНК, находились на 1—2-й стадиях энтоза. Так, в культуре MCF-7 12 из 19 внедрившихся клеток, находящихся на 1—2-й стадиях, включали метку BrdU (что составляет около 63 %). Ни одна из внедрившихся клеток на более поздних стадиях энтоза (3—5-я) метку не включала, что, по-видимому, связано с активацией процессов деградации.

Распределение белка p53 в энтозных клетках в культуре MCF-7. Одним из условий остановки прохождения клеточного цикла является перемещение белка p53 в ядро клетки. Анализ распределения p53 был проведен на клетках культуры MCF-7, имеющих белок p53 дикого типа. В этой культуре p53 присутствовал в ядре в 15.6 ± 0.1 % клеток ($n = 1410$). Среди энтозов встречались разные варианты распределения p53 (рис. 6): в ядрах и энтозной, и внедрившейся клеток, только в ядре

энтозной клетки, только в ядре внедрившейся клетки. Из обнаруженных 23 энтозных одноядерных клеток позитивное окрашивание ядра наблюдали в 6 энтозных клетках (26 %) и в 5 внедрившихся (22 %). В энтозной клетке с микроядрами p53 находился в ядре (рис. 6, *z, z'*). Таким образом, в энтозных и внедрившихся клетках p53 чаще присутствовал в ядре клеток, чем в популяции MCF-7 в целом.

Нарушение продвижения по клеточному циклу не препятствует энтозу. Для выяснения вопроса о том, могут ли клетки, заблокированные в одной из фаз клеточного цикла, вступать в энтоз, мы остановили клеточный цикл на границе фаз G₁ и S с помощью воздействия гидроксимочевинной. Гидроксимочевина подавляет активность рибонуклеотидредуктазы и ДНК-полимераз. Такое воздействие вызывает не только остановку клеточного цикла на границе фаз G₁ и S, но и препятству-

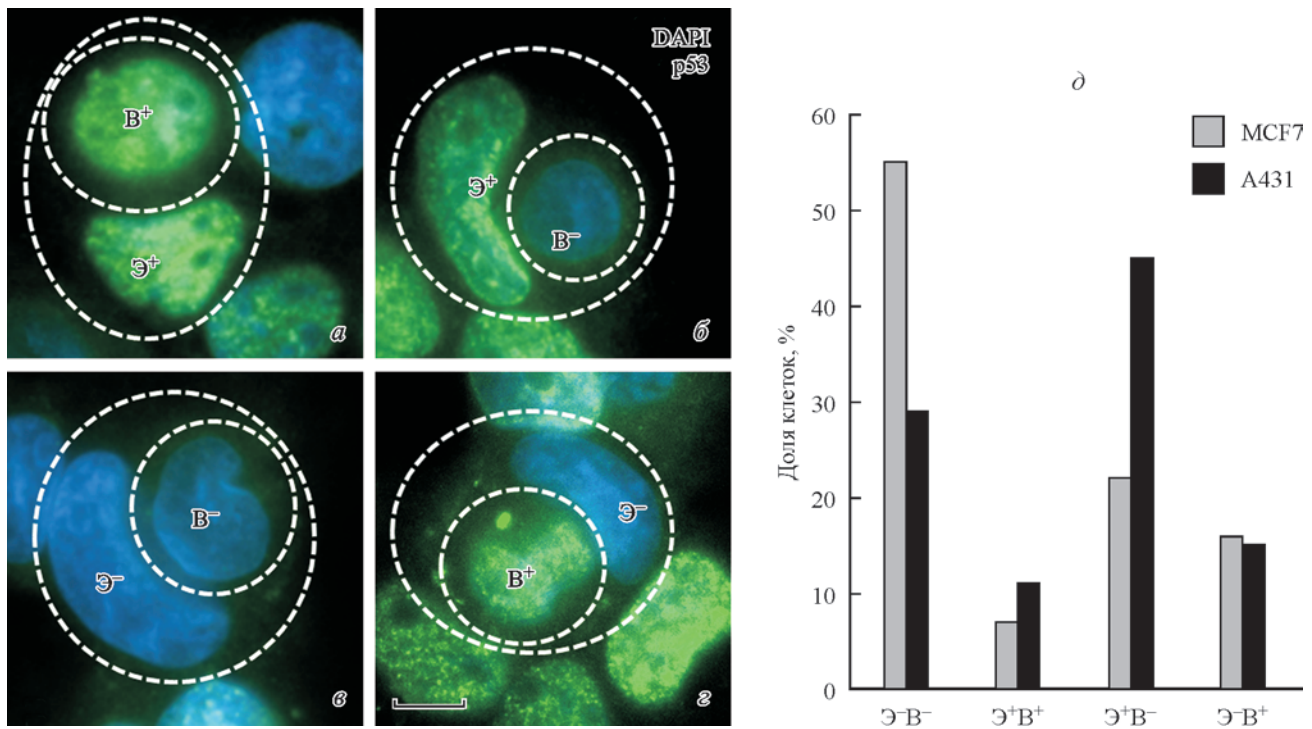


Рис. 5. Включение BrdU в ядра эндозной и внедрившейся клеток MCF-7.

a — эндозная и внедрившаяся клетки находятся в S-фазе клеточного цикла; *б* — эндозная клетка находится в S-фазе клеточного цикла; *в* — отсутствие репликации ДНК в эндозной и внедрившейся клетках; *г* — внедрившаяся клетка находится в S-периоде клеточного цикла. Окрашивание антителами против BrdU (зеленый сигнал), ядра клеток докрашены DAPI (синий сигнал). Белым контуром выделены эндозные клетки и эндозные вакуоли. Э⁻ — эндозная клетка, В⁻ — внедрившаяся клетка. Масштабный отрезок — 10 мкм. *д* — гистограмма частоты встречаемости гомо- и гетерофазных эндозов в клетках культур A431 (черные столбцы) и MCF-7 (серые столбцы). Э⁻ — эндозная клетка, не реплицирующая ДНК, Э⁺ — эндозная клетка, реплицирующая ДНК, В⁻ — внедрившаяся клетка, не реплицирующая ДНК, В⁺ — внедрившаяся клетка, реплицирующая ДНК (n = 89 для A431 и 69 для MCF7).

ет продвижению клеток по S-фазе (Maurer-Schultze et al., 1988). Наличие блока было подтверждено отсутствием включения BrdU клетками. Однако блокирование клеток на границе фаз G₁ и S не повлияло на число эндозов: 1.48 ± 0.5 % (MCF-7) и 0.95 ± 0.3 % (A431). Таким образом, нарушение продвижения клеток по клеточному циклу не препятствует процессу эндоза.

Влияние эндоза на полиплоидизацию клеток. Включение BrdU и наличие митозов в эндозных

и внедрившихся клетках указывают на их продвижение по клеточному циклу. При этом встречаются полиплоидные двуядерные эндозные и внедрившиеся клетки.

Для анализа ploidy эндозных и внедрившихся клеток был выбран метод измерения проекционной площади ядер. Для того чтобы определить, какие клетки можно считать полиплоидными, мы проанализировали проекционные площади ядер интерфазных клеток в обеих культурах (рис. 7, 8) и сравнили полученные данные

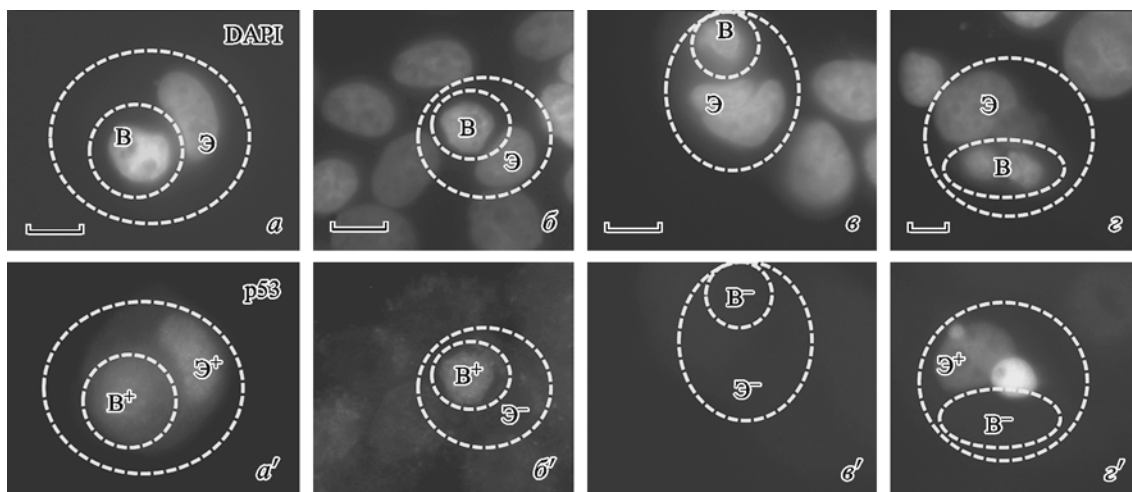


Рис. 6. Распределение белка p53 в эндозных клетках в культуре MCF-7.

a—*г* — окрашивание ядер DAPI; *a'*—*г'* — окрашивание с помощью антител против белка p53. Э — эндозная клетка, В — внедрившаяся клетка. Контуром выделены границы эндозной и внедрившейся клеток. Масштабный отрезок — 10 мкм.

с данными о плоидности, представленными в Каталоге Российской коллекции клеточных культур позвоночных (РККК П), откуда была получена культура клеток A431. По данным РККК П, 7 % клеток A431 являются полиплоидными. Проведенные нами измерения показали, что в культуре клеток A431 12.3 ± 2.4 % клеток имеют размер ядер более 200 мкм^2 (рис. 8), что согласуется с данными РККК П. Ядра клеток культуры MCF-7 в целом имеют большую проекционную площадь (только в 2 клетках размер ядра был меньше 100 мкм^2). При этом в культуре MCF-7 26.6 ± 0.15 % клеток имеют ядра размером более 250 мкм^2 (рис. 7). Таким образом, полученные нами данные согласуются с данными РККК П, и клетки с размером ядер более 250 мкм^2 (для MCF-7) и более 200 мкм^2 (для A431) можно отнести к полиплоидным клеткам. Кроме того, клетки с наименьшим размером ядер (до 150 мкм^2 для MCF-7 и до 100 мкм^2 для A431) можно считать предположительно диплоидными, находящимися в G_1 -фазе клеточного цикла.

Затем нами было проведено измерение проекционных площадей ядер энтозных клеток. В культуре клеток MCF-7 распределение ядер энтозных клеток по размеру в целом соответствовало распределению интерфазных ядер неэнтозных клеток. Около 25% энтозных клеток являлись полиплоидными, как и неэнтозные клетки. При этом 53.8 % энтозных полиплоидных клеток были двуядерными. Кроме того, было выявлено увеличение доли энтозных одноядерных клеток с ядрами наименьшего размера (около 29 %) (рис. 7). Такие клетки могут находиться в G_1 -фазе клеточного цикла.

При анализе проекционной площади ядер энтозных клеток в культуре A431 около 40 % составляли полиплоидные клетки, при этом преобладали клетки с ядрами наибольшей площади — более 300 мкм^2 (рис. 8). Так же как и в культуре MCF-7, 48.4 % полиплоидных энтозных клеток являлись двуядерными.

Таким образом, в обеих клеточных культурах присутствовали полиплоидные энтозные клетки. Для того чтобы выяснить, связана ли полиплоидизация с процессом энтоза, мы проанализировали проекционную площадь ядер энтозных клеток и сравнили ее со степенью деградации внедрившейся клетки. Как показано ранее, процесс деградации внедрившейся клетки занимает от 24 до 48 ч (Overholtzer et al., 2007; Garanina et al., 2017). Это время превышает продолжительность клеточного цикла, и энтозная клетка может пройти полиплоидизирующее митотическое деление. Мы оценивали степень деградации внедрившейся клетки по уменьшению проекционной площади ее ядра и по увеличению размера свободного пространства вакуоли между внедрившейся и энтозной клетками (рис. 9). С одной стороны, чем дольше внедрившаяся клетка находится внутри энтозной, тем выше степень ее деградации. С другой стороны, чем дольше длится энтоз, тем больше вероятность вступления энтозной клетки в митоз и увеличения размера ее ядра в случае нарушения сегрегации хромосом. Таким образом, если в процессе энтоза происходит полиплоидизация энтозной клетки, размер ядра (показатель полиплоидизации) энтозной клетки должен быть больше в тех энтозах, в которых внедрившаяся клетка находится на более поздней стадии деградации (показатель длительности энтоза).

Как уже упоминалось, энтозные клетки с размером ядер более 250 мкм^2 (для MCF-7) и более 200 мкм^2 (для A431) мы считали полиплоидными. В культуре MCF-7 внедрившиеся клетки с проекционной площадью ядра

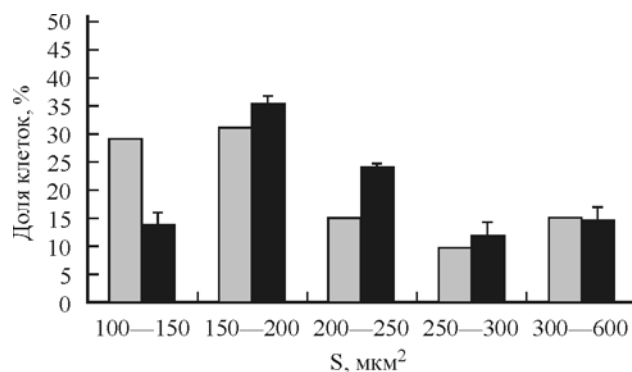


Рис. 7. Распределение ядер клеток культуры MCF-7 по их проекционной площади.

По горизонтали отложены диапазоны изменения проекционных площадей ядер; по вертикали — доля клеток, имеющих данную проекционную площадь ядер. Черные столбцы — распределение ядер в интерфазных неэнтозных клетках ($n = 800$, вертикальные отрезки показывают стандартное отклонение), серые столбцы — распределение ядер в энтозных клетках ($n = 93$, стандартное отклонение не определяли, так как энтозы представляют собой редкое явление).

менее 80 мкм^2 считали деградирующими (так как размер ядер интерфазных клеток в контроле был более 80 мкм^2). В культуре A431 клетки с проекционной площадью ядра менее 60 мкм^2 считали деградирующими (так как размер ядер в контроле интерфазных клеток был более 64 мкм^2). В обеих культурах деградирующими считали внедрившиеся клетки при размере свободного пространства вакуоли более 50 мкм^2 .

В обеих культурах в неполиплоидных энтозных клетках внедрившаяся клетка равновероятно имеет неизменное строение ядра или проявляет признаки его деградации (рис. 9, б). Однако в полиплоидных энтозных клетках ядро внедрившейся клетки чаще всего находится на стадии деградации. При анализе числа энтозов, в которых происходит увеличение свободного пространства вакуоли (рис. 9, в), нами было обнаружено, что этот процесс характерен и для диплоидных, и для полиплоидных энтозных клеток. Однако среди полиплоидных энтозных

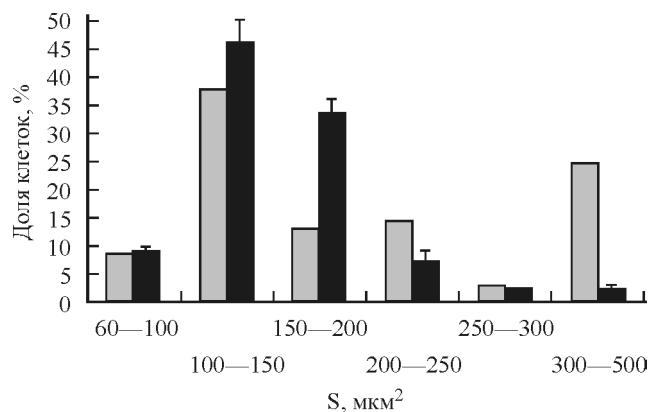


Рис. 8. Распределение ядер клеток культуры A431 по их проекционной площади.

По горизонтали отложены диапазоны изменения проекционных площадей ядер; по вертикали — доля клеток, имеющих данную проекционную площадь. Черные столбцы — распределение ядер в интерфазных неэнтозных клетках ($n = 800$, вертикальные отрезки показывают стандартное отклонение), серые столбцы — распределение ядер в энтозных клетках ($n = 70$, стандартное отклонение не определяли, так как энтозы представляют собой редкое явление).

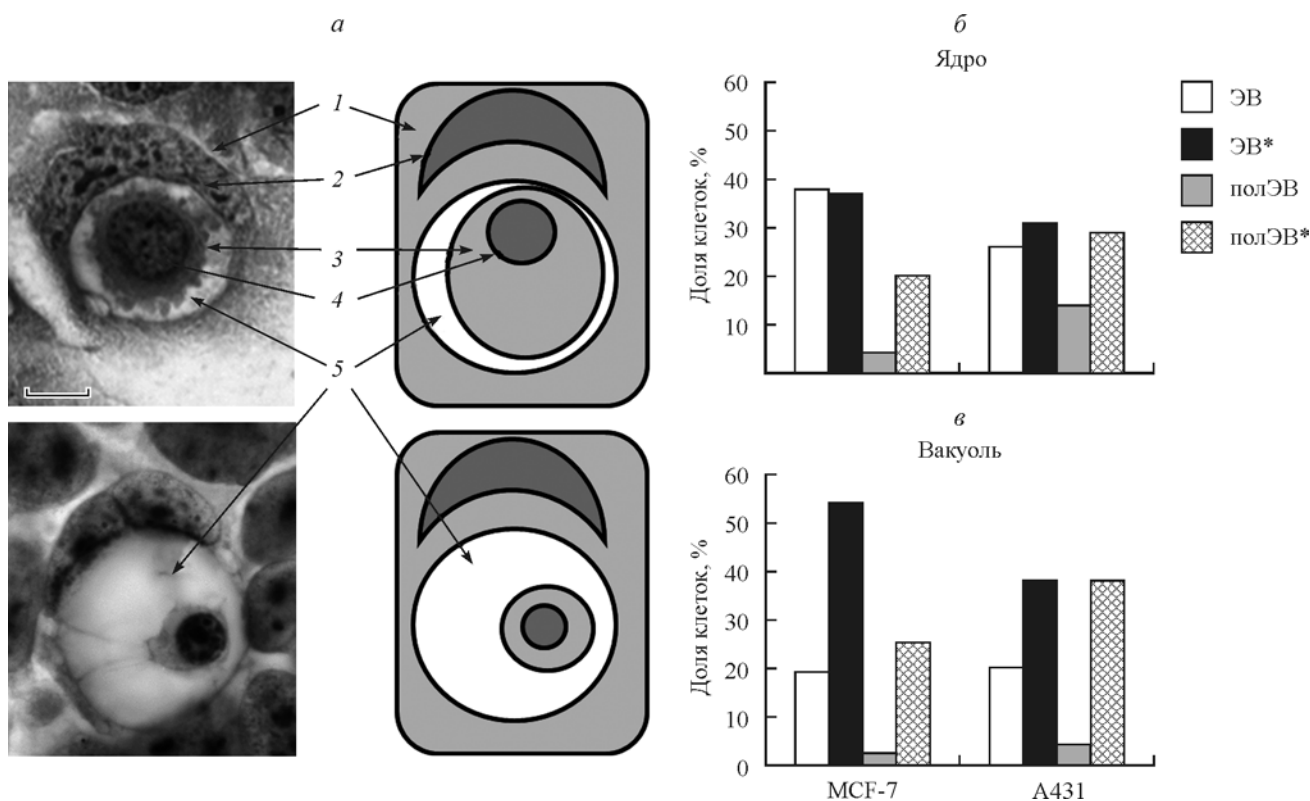


Рис. 9. Изменение размера ядра внедрившейся клетки и энтозной вакуоли в процессе деградации.

a — схема изменения размера ядра и энтозной вакуоли в процессе деградации внедрившейся клетки. В процессе деградации внедрившейся клетки происходят уменьшение размера ее ядра и увеличение свободного пространства энтозной вакуоли. 1 — энтозная клетка, 2 — ядро энтозной клетки, 3 — внедрившаяся клетка, 4 — ядро внедрившейся клетки, 5 — свободное пространство энтозной вакуоли. *б* — анализ изменения размера ядра. *в* — анализ изменения размера вакуоли. ЭВ — энтоз, в котором энтозная клетка имеет размер ядра до 200 (A431) или 250 (MCF-7) мкм², внедрившаяся клетка не имеет признаков деградации; ЭВ* — энтоз, в котором энтозная клетка имеет размер ядра до 200 (A431) или 250 (MCF-7) мкм², внедрившаяся клетка имеет признаки деградации; полЭВ — энтоз, в котором полиплоидная энтозная клетка имеет размер ядра более 200 (A431) и 250 (MCF-7) мкм², внедрившаяся клетка не имеет признаков деградации; полЭВ* — энтоз, в котором полиплоидная энтозная клетка имеет размер ядра более 200 (A431) и 250 (MCF-7) мкм², внедрившаяся клетка имеет признаки деградации; n = 95 для клеток MCF-7 и 71 для клеток A431.

клеток доля вакуолей с бóльшим свободным пространством выше, чем в диплоидных энтозных клетках. Таким образом, в обеих культурах среди полиплоидных энтозных клеток внедрившиеся клетки значительно чаще находились на стадии деградации. Этот факт может указывать на увеличение пloidности энтозных клеток в процессе энтоза.

Обсуждение

Влияние процесса энтоза на продвижение по клеточному циклу. Явление энтоза описано для многих типов опухолевых клеток *in vitro* и *in vivo*. Однако его биологическое значение во многом остается неясным. Повышенное число энтозов коррелирует с неблагоприятным прогнозом развития опухоли. Возможно, такая корреляция связана с тем, что вступление в митоз энтозной клетки приводит к ее полиплоидизации в результате нарушения цитокинеза (Krajcovic et al., 2011; Krajcovic, Overholtzer, 2012). Таким образом, продвижение по клеточному циклу энтозной и внедрившейся клеток может оказывать влияние на полиплоидизацию опухолевых клеток и генетическую нестабильность популяции. Наличие белка p53 дикого типа, являющегося ключевым регулятором клеточного цикла (Чумаков, 2007; Копнин и др., 2008; Mello, Attardi, 2018), должно влиять на продвижение клеток по клеточному циклу в процессе энтоза.

Проведенное нами исследование показало, что в обеих исследованных культурах и энтозная, и внедрившаяся клетки способны продвигаться по клеточному циклу. На это указывают включение репликативной метки и наличие митотических фигур в процессе энтоза. Однако присутствие крупной вакуоли может влиять на продвижение энтозных клеток по клеточному циклу в культуре p53+. Так, нами обнаружено нарушение вступления в S-фазу энтозных клеток MCF-7, находящихся на поздних стадиях энтоза. В данной культуре продвижение по клеточному циклу энтозной клетки, по-видимому, возможно только на начальных этапах (1—3-я стадии) энтоза. Длительный процесс лизосомно-опосредованной деградации препятствует вступлению энтозной клетки в S-фазу.

Пребывание внедрившейся клетки внутри энтозной вакуоли также вызывает изменения в прохождении митотического деления внедрившейся клеткой. Во внедрившихся клетках часто нарушается правильная организация системы микротрубочек. На фотографиях, представленных в некоторых статьях (Krajcovic et al., 2011), сеть микротрубочек во внедрившихся клетках выглядит нарушенной. Однако авторы этот факт не обсуждают. Скорее всего, при вступлении в митоз внутренняя клетка не способна сформировать нормальное веретено деления, что должно в свою очередь нарушать расхождение хромосом и вызывать формирование полиплоидных клеток. Выход такой клетки из энтозной вакуоли после завершения ми-

тоза может приводить к увеличению числа полиплоидных клеток в популяции. Таким образом, митоз не только энтозной, но и внедрившейся клеток может служить источником генетической нестабильности и стимулировать опухолевую прогрессию в целом.

Полиплоидизация энтозной клетки. Одним из показателей нарушения прохождения клеточного цикла является полиплоидизация клеток. Проведенное нами исследование показало, что в обоих исследованных культурах присутствуют полиплоидные энтозные клетки. Примерно половина из этих клеток являются двоядерными и, вероятно, образовались в результате нарушения цитокинеза энтозной клетки (Krajcovic et al., 2011). Тот факт, что среди полиплоидных клеток только половина является двоядерными, а остальные клетки имеют ядро большого размера, может указывать на то, что наличие энтозной вакуоли не только вызывает нарушения цитокинеза, но и влияет на расхождение хромосом.

В зависимости от наличия в клетках белка p53 дикого типа доля полиплоидных энтозных клеток различается. В отличие от MCF-7 (p53+) именно в культуре A431 (p53-) значительная доля энтозных клеток является полиплоидными.

Полиплоидизация энтозных клеток A431 может быть связана с их продвижением по клеточному циклу, в то время как энтозные клетки MCF-7 останавливаются в G₁-фазе. Действительно, доля энтозных клеток в S-фазе в культуре клеток A431 выше, чем в MCF-7, и выше, чем в популяции A431 в целом. Деградирующая внедрившаяся клетка может являться дополнительным источником питательных веществ для энтозной клетки (Krajcovic et al., 2013; Durgan et al., 2017; Namann et al., 2017), что и стимулирует вступление клеток в фазу репликации. В отличие от A431 в культуре MCF-7 (p53+) дегградация внедрившейся клетки, по-видимому, активирует белок p53 и препятствует вступлению в S-фазу. Тем не менее в культуре MCF-7 встречаются и митотические, и полиплоидные энтозные клетки. Поскольку p53 регулирует прежде всего точку проверки клеточного цикла в G₁-фазе, можно предположить, что клетки, внедрение в которые произошло в G₁-фазе, останавливаются в продвижении по клеточному циклу. Клетки, внедрение в которые произошло в других фазах клеточного цикла, продвигаются по циклу, вступают в митоз и полиплоидизируются.

Поглощение и внедрение клеток в зависимости от фазы клеточного цикла. Механизмы внедрения одной клетки в другую и ее последующей дегградации в настоящее время достаточно полно описаны. Однако практически неисследованным остается вопрос о том, что заставляет клетку внедряться и какие клетки могут служить мишенями для внедрения. Некоторые фазы клеточного цикла могут являться предпочтительными для внедрения и поглощения клеток.

Мишени внедрения. В литературе присутствуют отрывочные данные о ряде характеристик клеток-мишеней. Так, на клетках опухоли поджелудочной железы показано, что энтозные клетки одновременно имеют маркеры эпителиальных клеток (EMA и AE1E3), фибробластов (визментин) и фагоцитов (CD68) (Cano et al., 2012). Однако авторы не обсуждают происхождение энтозных клеток.

Можно предположить, что в некоторых культурах, таких как A431, вероятность стать мишенью внедрения будет выше у клеток, имеющих большую площадь, т. е. у полиплоидных клеток. И именно этим объясняется значительная доля полиплоидных энтозных клеток.

В культуре MCF-7 повышенная доля энтозных клеток с ядром наименьшего размера может указывать на то, что мишенями для внедрения являются клетки на стадии G₁ клеточного цикла. Механизм этого процесса неясен, но можно предположить, что, поскольку для взаимодействия с внедряющейся клеткой необходимо образование адгезивных контактов, экспрессия E-кадгерина может быть повышена в G₁-фазе в этом типе клеток. Косвенным подтверждением данного предположения являются данные о том, что гиперэкспрессия E-кадгерина ведет к β-катенин-зависимой задержке клеток в G₁-фазе (Stockinger et al., 2001). Возможно, клетки культуры MCF-7, задержавшиеся в G₁-фазе за счет активации p53, экспрессируют больше кадгеринов и являются удобными мишенями для внедрения. Возможна и обратная ситуация. Если внедрение произошло в G₁-фазе, такие энтозные клетки гиперэкспрессируют кадгерины, образуя множественные контакты с внедрившейся клеткой, что приводит к задержке ее дегградации. Задержка дегградации и наличие энтозной вакуоли в свою очередь вызывают остановку в продвижении по клеточному циклу. Таким образом, можно предположить, что процесс энтоза вызывает активацию p53. На это указывает повышенная доля p53+ энтозных клеток.

Внедряющиеся клетки. В настоящее время практически неисследованным остается вопрос, почему отдельные клетки в популяции приобретают сферическую форму и способность внедряться в другие клетки. Можно предположить, что одними из главных факторов этих процессов должны быть нарушения контакта клетки с внеклеточным матриксом. При этом такая ошаренная клетка при контакте с распластанной клеткой сохраняет способность формировать адгезивные контакты и десмосомы (Overholtzer et al., 2007; Garanina et al., 2017), что позволяет ей внедряться в будущую энтозную клетку.

В жизненном цикле клетки существует момент, когда она теряет контакты с матриксом и полярность. В поздней телофазе при формировании дочерних клеток происходит перестройка подмембранного актинового цитоскелета. Значительная часть интегриновых рецепторов поглощается путем эндоцитоза (Pellinen et al., 2008; Paul et al., 2015). Дочерние клетки в этой фазе клеточного цикла, как правило, ошарены, на их поверхности присутствуют многочисленные выпячивания мембраны. Внедрение дочерних клеток, закончивших митоз, описано для культуры 16HBE и MCF-7 (Durgan et al., 2017; Durgan, Florey, 2018). Наблюдаемые нами картины, когда клетки в поздней телофазе формируют кратер в интерфазных клетках, также могут отражать процесс внедрения. Однако для подтверждения внедрения клеток на этой стадии необходимо провести дополнительные исследования с применением корреляционной сканирующей электронной микроскопии. Таким образом, поздняя телофаза является одной из фаз клеточного цикла, которая облегчает внедрение клеток.

В целом, возможно, существуют фазы клеточного цикла, на которых облегчаются процессы внедрения и поглощения клеток. Однако для определения этих фаз требуются дальнейшие исследования.

Можно заключить, что в клетках культуры MCF-7 повышенная доля энтозных клеток с наименьшим размером ядра может быть обусловлена p53-опосредованной остановкой в продвижении по клеточному циклу либо предпочтительным внедрением в клетки G₁-фазы. В A431 (p53-) повышенная доля полиплоидных энтозных кле-

ток может быть связана как с полиплоидизацией в процессе энтоза в условиях нарушенной регуляции клеточного цикла, так и с предпочтительным внедрением в полиплоидные клетки.

В целом и энтозная, и внедрившаяся клетки способны продвигаться по клеточному циклу. Сам процесс энтоза может приводить к полиплоидизации энтозной и внедрившейся клеток. Наличие белка p53 дикого типа частично подавляет полиплоидизацию энтозной клетки и(или) вызывает остановку в прохождении клеточного цикла в G₁-фазе. Таким образом, по-видимому, в опухолях с белком p53 дикого типа энтоз способен в меньшей степени вносить вклад в полиплоидизацию и влиять на генетическую нестабильность опухолевых клеток по сравнению с p53-опухолевыми клетками.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-50-00029).

Список литературы

- Копнин Б. П., Копнин П. Б., Хромова Н. В., Аганова Х. С. 2008. Многоликий p53: разнообразие форм, функций, опухоле- супрессирующих и онкогенных активностей. Клиническая онкогематология. 1 : 2—9. (Копнин Б. П., Копнин П. Б., Хромова Н. В., Аганова Х. С. 2008. Multifaced p53: variety of forms, functions, tumor-suppressive and oncogenic activities. Clinical Oncohematology. 1 : 2—9.)
- Чумаков П. М. 2007. Белок p53 и его универсальные функции в многоклеточном организме. Успехи биол. химии. 47 : 3—52. (Chumakov P. M. 2007. Protein p53 and its universal functions in a multicellular organisms. Advances in Biol. Chem. 47 : 3—52.)
- Brouwer M., de Ley L., Feltkamp C. A., Elema J., Jongstra A. P. 1984. Serum-dependent «cannibalism» and autodestruction in cultures of human small cell carcinoma of the lung. Cancer Res. 44 : 2947—2951.
- Cano C. E., Sandi M. J., Hamidi T., Calvo E. L., Turrini O., Bartholin L., Loncle C., Secq V., Garcia S., Lomber G., Kroemer G., Urrutia R., Iovanna J. L. 2012. Homotypic cell cannibalism, a cell-death process regulated by the nuclear protein 1, opposes to metastasis in pancreatic cancer. EMBO Mol. Med. 4 : 964—979.
- Durgan J., Florey O. 2018. Cancer cell cannibalism: multiple triggers emerge for entosis. Biochim. biophys. acta. 1865 : 831—841.
- Durgan J., Tseng Y. Y., Hamann J. C., Domart M. C., Collinson L., Hall A., Overholtzer M., Florey O. 2017. Mitosis can drive cell cannibalism through entosis. Elife. 11 : pii e27134.
- Fais S. 2007. Cannibalism: a way to feed on metastatic tumors. Cancer Lett. 258 : 155—164.
- Garanina A. S., Kisurina-Evgenieva O. P., Erokhina M. V., Smirnova E. A., Factor V. M., Onishchenko G. E. 2017. Consecutive entosis stages in human substrate-dependent cultured cells. Sci. Rep. 7 : 12555.
- Hamann J. C., Surcel A., Chen R., Teragawa C., Albeck J. G., Robinson D. N., Overholtzer M. 2017. Entosis is induced by glucose starvation. Cell Rep. 20 : 201—210.
- Krajcovic M., Johnson N. B., Sun Q., Normand G., Hoover N., Yao E., Richardson A. L., King R. W., Cibas E. S., Schnitt S. J., Brugge J. S., Overholtzer M. 2011. A non-genetic route to aneuploidy in human cancers. Nat. Cell Biol. 13 : 324—330.
- Krajcovic M., Krishna S., Akkari L., Joyce J. A., Overholtzer M. 2013. mTOR regulates phagosome and entotic vacuole fission. Mol. Biol. Cell. 24 : 3736—3745.
- Krajcovic M., Overholtzer M. 2012. Mechanisms of ploidy increase in human cancers: a new role for cell cannibalism. Cancer Res. 72 : 1596—1601.
- Maurer-Schultze B., Siebert M., Bassukas I. D. 1988. An *in vivo* study on the synchronizing effect of hydroxyurea. Exp. Cell Res. 174 : 230—243.
- Mello S. S., Attardi L. D. 2018. Deciphering p53 signaling in tumor suppression. Curr. Opin. Cell Biol. 51 : 65—72.
- Overholtzer M., Brugge J. S. 2008. The cell biology of cell-in-cell structures. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 9 : 796—809.
- Overholtzer M., Mailleux A. A., Mouneimne G., Normand G., Schnitt S. J., King R. W., Cibas E. S., Brugge J. S. 2007. A nonapoptotic cell death process, entosis, that occurs by cell-in-cell invasion. Cell. 131 : 966—979.
- Paul N. R., Jacquemet G., Caswell P. T. 2015. Endocytic trafficking of integrins in cell migration. Curr. Biol. 25 : R1092—R1105.
- Pellinen T., Tuomi S., Arjonen A., Wolf M., Edgren H., Meyer H., Grosse R., Kitzing T., Rantala J. K., Kallioniemi O., Fassler R., Kallio M., Ivaska J. 2008. Integrin trafficking regulated by Rab21 is necessary for cytokinesis. Develop. Cell. 15 : 371—385.
- Reiss M., Brash D. E., Muñoz-Antonia T., Simon J. A., Ziegler A., Vellucci V. F., Zhou Z. L. 1992. Status of the p53 tumor suppressor gene in human squamous carcinoma cell lines. Oncol. Res. 4 : 349—357.
- Sharma N., Dey P. 2011. Cell cannibalism and cancer. Diagn. Cytopathol. 39 : 229—233.
- Stockinger A., Eger A., Wolf J., Beug H., Foisner R. 2001. E-cadherin regulates cell growth by modulating proliferation-dependent beta-catenin transcriptional activity. J. Cell Biol. 154 : 1185—1196.
- Yang Y.-Q., Li J.-C. 2012. Progress of research in cell-in-cell phenomena. Anat. Rec. 295 : 372—377.

Поступила 21 V 2018

ENTOSIS AND CELL CYCLE IN TUMOR CELL CULTURE

O. P. Kisurina-Evgenieva,* L. A. Khashba, M. A. Savitskaya, G. E. Onishchenko

Department of Cell Biology and Histology, Faculty of Biology,
M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234;

* e-mail: evgengeva@mail.ru

Entosis is a type of cell cannibalism during which one tumor cell invades the other tumor cell. The fate of inner cell can be different: it can leave the entotic vacuole, divide within it, or be subjected to lysosome-mediated degradation. The aim of our work was to determine whether MCF7 (p53+) human breast adenocarcinoma cells and A431 (p53-) human epidermoid carcinoma cells can pass cell cycle during entosis. The percent of entotic cells was $1.01 \pm 0.37\%$ in MCF7 culture and $0.42 \pm 0.27\%$ in A431 culture. It was shown that inner cells as well as outer cells could synthesize DNA (BrdU incorporation) and enter into mitosis. Morphometric

analysis showed polyploidisation of outer cells. This process is most pronounced in A431 (p53⁻) cell line. In addition, polyploid cells may be the preferred targets of invasion in this culture. In MCF-7 cell line the number of G₁-phase entotic cells was increased, which may be due to p53-mediated cell cycle arrest, or the preferred invasion in G₁-phase cells. Overall, in tumors with active protein p53 entosis will be less available to contribute to the polyploidy and genetic instability of tumor cells compared with p53-tumor cells.

Key words: entosis, cell cycle, p53
