

УДК 57.576.31

НЕОБЫЧНЫЙ СПОСОБ МИТОПТОЗА ОБНАРУЖЕН В КЛЕТКАХ КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА

© 2020 г. Е. А. Пименова^{1,*}, Ю. А. Реунова¹, Е. С. Менчинская²,
А. А. Реунов^{1,3}, член-корреспондент РАН Д. Л. Аминин^{2,4}

Поступило 22.05.2020 г.

После доработки 07.06.2020 г.

Принято к публикации 09.06.2020 г.

В результате комплексного микроскопического исследования деструкции клеток асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) мыши в условиях голодания установлено, что кроме апоптоза, некроза и апототического некроза, уже известных для АКЭ, разрушение клеток может происходить путем митохондриального автолиза, который предлагается считать новой разновидностью митоптоза. Особенностью митоптоза в АКЭ является появление большого количества автолизирующихся митохондрий, слияние которых приводит к разрыву клеточной мембраны и выбросу ядра из клетки. Предполагается, что полиморфность способов деструкции АКЭ объясняется разным физиологическим состоянием клеток, предопределяющим “выбор” механизма их гибели. Данная ситуация ставит перед исследователями задачу разработки комплексных индукторов, обладающих способностью к стимуляции всех возможных типов гибели раковых клеток.

Ключевые слова: асцитная карцинома Эрлиха, митохондрии, митоптоз

DOI: 10.31857/S2686738920050182

Исследование механизмов деструкции раковых клеток является сегодня предметом повышенного внимания в связи с необходимостью изобретения эффективных антиопухолевых индукторов [1–7]. Асцитная карцинома Эрлиха мыши (АКЭ) обладает относительно высокой чувствительностью к терапевтическому воздействию, что делает ее удобной моделью для изучения различных аспектов программированной гибели [8–10]. В результате исследования деструкции клеток, находящихся в одинаковых культуральных условиях монослойной АКЭ, выявлены как апоптоз, так и некроз [11]. Кроме того, обнаружен третий паттерн клеточной гибели, соответствующий морфологической модели апототического некроза [12]. Показано, что сдвиг в сторону некроза может быть достигнут при ис-

пользовании антиопухолевого индуктора кукумуриозид А₂-2 [12], применение которого активизирует цитоплазматический и ядерный автолиз, происходящий при активной экспрессии калпаина и каспазы-1 [7].

В результате данной работы, выполненной на клетках АКЭ в условиях имитации голодания, установлено, что разрушение клеток может также происходить ранее неизвестным способом, при котором постепенное слияние вакуолизованных митохондрий приводит к разрыву клеточной мембраны и выходу клеточного ядра в межклеточное пространство. Этот вариант клеточной гибели трактуется нами как ранее неизвестная разновидность митоптоза, которую мы условно характеризуем как “катастрофический митоптоз”. Выявление митоптоза, функционирующего в АКЭ наряду с другими типами деструкции, дополняет представление о полиморфности механизмов клеточной гибели в АКЭ. Наличие в АКЭ морфологически разных деструктивных вариантов позволяет сделать предположение о физиологической неоднородности клеток, предопределяющей “выбор” способа самоуничтожения, и ставит вопрос о необходимости создания комплексных индукторов, способных к активации всех возможных вариантов деструкции, функционирующей в опухолях.

¹ Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток, Россия

² Тихоокеанский Институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток, Россия

³ Университет Святого Франциска Ксавьера, Антигонииш, Новая Шотландия, Канада

⁴ Медицинский университет, Гаосюн, Тайвань

*e-mail: eapimenova@yandex.ru

В экспериментах использовали музейный тетраплоидный штамм клеток мышинной АКЭ, полученный из “НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина” Минздрава России (Москва). Клетки АКЭ пассировали в брюшной полости белых беспородных мышей обоего пола весом 18–20 г. Для эксперимента клетки отбирали на 7–10 день после инокуляции опухоли. Для этого мышей забивали методом перивисцеральной дислокации и с помощью шприца собирали асцитическую жидкость, содержащую опухолевые клетки. Клетки дважды отмывали от экссудата центрифугированием при 1500 об/мин (450 g) в течение 10 мин на центрифуге Heraeus Labofuge 400R (Германия) в фосфатно-солевом буферном растворе.

Клетки в концентрации $2-5 \times 10^6$ клеток/мл помещали в 24-луночные планшеты и инкубировали в культуральной среде DMEM, содержащей L-глутамин (2 mM), FCS (10%) и гентамицин (100 мкг/мл) в CO₂-инкубаторе при 37°C в течение 24 ч. Для индукции клеточной деструкции, вызванной голоданием, клетки инкубировали в обедненной среде, состоящей только из фосфатно-солевого буферного раствора и не содержащего сыворотку и L-глутамин. Через 24 ч суспензию клеток отбирали, переносили в пробирки типа эппендорф и осаждали центрифугированием при 1500 об/мин (400 g) в течение 5 мин.

Для микроскопического анализа клетки фиксировали в 2.5%-м глютаральдегиде на 0.1M какодилатном буфере. После фиксации клетки поместили в 1X PBS. Для изучения клеточной суспензии методом фазово-контрастной микроскопии использовали микроскоп Zeiss Axiovert 200M Apotome (Германия). Для исследования методом сканирующей электронной микроскопии суспензию клеток помещали на поверхность покровных стекол Thermanox® Plastic Coverslips (США), выдерживали до их оседания 30 мин и обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации и ацетоне. После этого образцы окончательно высушивали в диоксиде углерода по методике сушки в критической точке, используя прибор фирмы BAL-TEC (critical point dryer 030, Германия), помещали на поверхность алюминиевых столиков и напыляли углеродом. Анализировали образцы на сканирующем электронном микроскопе Zeiss EVO 40 (Германия). Для исследования методом трансмиссионной электронной микроскопии клеточную суспензию дофиксировали в 2%-м растворе OsO₄ на 0.1M какодилатном буфере. После обезвоживания в спиртах и ацетоне материал заключали в Аралдит. Ультратонкие срезы толщиной 80 нм получали с использованием ультрамикротомы Ultracut Leica UC6 (Германия) и помещали на медные бленды, покрытые формваровой подложкой. Срезы окрашивали растворами уранил-

ацетата и цитрата свинца и изучали в электронном микроскопе Zeiss Libra 120 (Германия).

В результате исследования установлено, что в условиях бедного питания значительная часть клеток АКЭ погибает ранее неизвестным способом. Показано, что происходит модификация митохондрий; эти органеллы увеличиваются в размере и утрачивают большую часть митохондриальных крист, которые формируют закрученные мембранные конгломераты, расположенные в центре митохондрий. Такие митохондрии имеют электронно-светлое содержимое, напоминая этим вакуоли (рис. 1a). По-видимому, вакуолизация митохондрий происходит благодаря автолизу содержимого этих органелл. Вакуолизованные митохондрии образуют скопления и контактируют друг с другом (рис. 1б). На поздней стадии деструкции часть сливающихся митохондрий локализована около клеточной мембраны, в которой возникает отверстие, формируемое благодаря сливанию мембраны одной из вакуолизованных митохондрий и клеточной мембраны (рис. 1в). Некоторые вакуолизованные митохондрии контактируют с клеточным ядром (рис. 1г). Благодаря сливанию вакуолизованных митохондрий вокруг клеточного ядра формируется полость, а также происходит расширение отверстия в клеточной мембране (рис. 1д). Установлено, что благодаря наличию отверстия в клеточной мембране происходит выброс клеточного ядра через это отверстие (рис. 1е, ж). В результате появляются клетки, имеющие отверстие, через которое ранее произошел выброс ядра (рис. 1з, и).

Как показали наши исследования, гибель клеток АКЭ происходит в результате трансформации митохондрий, и этот способ, по-видимому, можно считать разновидностью митоптоза. Согласно литературным данным, при митоптозе происходит разрушение внутренней митохондриальной структуры при сохранении целостности внешней мембраны. В определенных состояниях разрушается внешняя митохондриальная мембрана, а внутренняя структура какое-то время сохраняет целостность. Известно, что деградировавшие митохондрии либо утилизируются автофагосомами, либо высвобождаются из клетки в виде митоптических тел [13–15].

Митоптоз в АКЭ — это прогрессирующее сливание автолизирующихся митохондрий, формирующих единую внутриклеточную полость, через которую происходит эвакуация клеточного ядра в межклеточное пространство. Необходимо отметить, что данный способ митоптоза не был описан ранее ни для клеток АКЭ, ни для других типов опухолевых клеток. По нашему мнению, данный вариант митохондриальной деструкции, который мы предлагаем условно охарактеризовать как “катастрофический митоптоз”, может дополнить

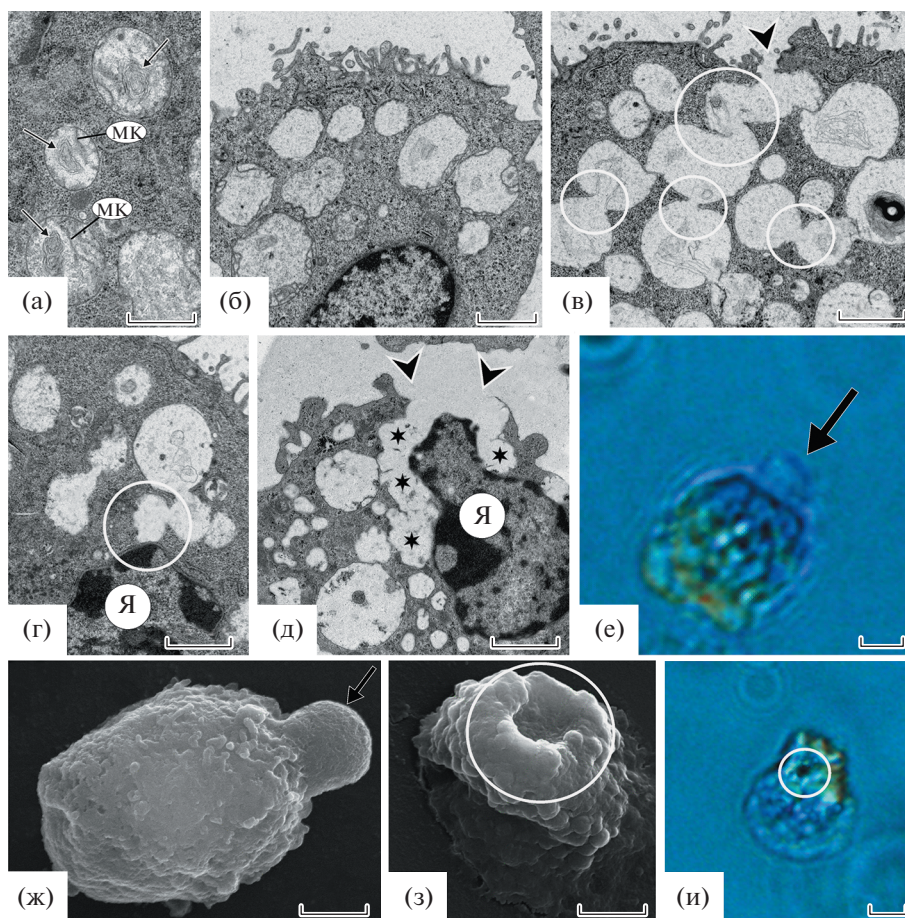


Рис. 1. Клетки асцитной карциномы Эрлиха, подвергающиеся катастрофическому митоптозу. (а) — начальная стадия вакуолизации митохондрий; органеллы увеличиваются в размере и утрачивают большую часть митохондриальных крист (МК), которые формируют закрученные мембранные конгломераты, расположенные в центре митохондрий (показаны стрелками), трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ), масштаб 0.5 мкм; (б) — прогрессирующая стадия вакуолизации митохондрий; вакуолизованные митохондрии формируют скопления и контактируют друг с другом, ТЭМ, масштаб 0.5 мкм; (в) — прогрессирующая стадия вакуолизации митохондрий; появление соединительных каналов между вакуолизованными митохондриями (показаны окружностями) и отверстия в клеточной мембране (показано наконечником стрелки), формируемого благодаря сливанию мембраны одной из вакуолизованных митохондрий и клеточной мембраны, ТЭМ, масштаб 0.5 мкм; (г) — прогрессирующая стадия вакуолизации митохондрий; вакуолизованные митохондрии, контактируют с клеточным ядром (Я) (место контакта показано окружностью), ТЭМ, масштаб 0.5 мкм; (д) — завершающая стадия вакуолизации митохондрий; благодаря сливанию вакуолизованных митохондрий около ядра (Я) формируется околядерная полость (показана звездочками), а также происходит расширение отверстия в клеточной мембране (показано наконечниками стрелки), ТЭМ, масштаб 0.5 мкм; (е) — выброс ядра (ядро показано стрелкой) через разрыв клеточной мембраны, фазово-контрастная микроскопия (ФКМ), масштаб 1 мкм; (ж) — выброс ядра (ядро показано стрелкой) через разрыв клеточной мембраны, сканирующая электронная микроскопия (СЭМ), масштаб 1 мкм; (з) — погибающая клетка, имеющая разрыв (указан окружностью), через который ранее произошел выброс ядра; СЭМ, масштаб 1 мкм; (и) — погибающая клетка, имеющая разрыв (указан окружностью), через который ранее произошел выброс ядра, ФКМ, масштаб 1 мкм.

список уже известных разновидностей митоптоза. Учитывая ярко выраженный травматический характер данного процесса, приводящего к тотальному коллапсу клетки, поиск подходов к его стимуляции является перспективной задачей при разработке стратегии борьбы с канцерогенезом.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Д.В. Фомину за помощь в использовании оборудования центра кол-

лективного пользования ННЦМБ ДВО РАН (Владивосток, Россия). Часть исследования проведена в лаборатории электронной микроскопии Университета Святого Франциска Ксавьера (Антигониш, Новая Шотландия, Канада).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bruin D.E.C., Medema J.P. Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment re-

- sponse // *Cancer Treat. Rev.* 2008. V. 34. P. 737–749.
<https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2008.07.001>
2. *Rufini A., Melino G.* Cell death pathology: The war against cancer // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2011. V. 414. P. 445–450.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.09.110>
 3. *Dimou A., Syrigos N.K., Saif M.W.* Overcoming the stromal barrier: technologies to optimize drug delivery in pancreatic cancer // *Ther. Adv. Med. Oncol.* 2012. V. 4. P. 271–279.
<https://doi.org/10.1177/1758834012446008>
 4. *Moriwaki K., Chan F.K.M.* RIP3: a molecular switch for necrosis and inflammation // *Genes Dev.* 2013. V. 27. P. 1640–1649.
<https://doi.org/10.1101/gad.223321.113>
 5. *Cho Y.S., Park S.Y.* Harnessing of programmed necrosis for fighting against cancers // *Biomol. Ther.* 2014. V. 22. P. 167–175.
<https://doi.org/10.4062/biomolther.2014.046>
 6. *Osorio-Vega H., Finol H.J., Roschman-González A., et al.* Colon adenocarcinoma and cell death types: an ultrastructural study // *Acta Microsc.* 2016. V. 25. P. 65–70.
 7. *Reunov A.A., Reunov A.V., Pimenova E.A., et al.* The study of the calpain and caspase-1 expression in ultrastructural dynamics of Ehrlich ascites carcinoma necrosis // *Gene.* 2018. V. 658. P. 1–9.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.03.012>
 8. *Ozaslan M., Karagoz I.D., Kilic I.H., et al.* Ehrlich ascites carcinoma // *Afr. J. Biotechnol.* 2011. V. 10. P. 2375–2378.
<https://doi.org/10.5897/AJBx10.017>
 9. *Da Mota M.F., Benfica P.L., Batista A.C., et al.* Investigation of Ehrlich ascites tumor cell death mechanisms induced by *Synadenium umbellatum* Pax // *J. Ethnopharmacol.* 2012. V. 139. P. 319–329.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.04.055>
 10. *Osman A.M.M., Alqahtani A.A., Damanhouri Z.A., et al.* Dimethylsulfoxide exacerbates cisplatin-induced cytotoxicity in Ehrlich ascites carcinoma cells // *Cancer Cell Int.* 2015. V. 15. P. 104–117.
<https://doi.org/10.1186/s12935-015-0258-1>
 11. *Menchinskaya E.S., Pisyagin E.A., Kovalchik S.N., et al.* Antitumor activity of cucumarioside A₂-2 // *Chemotherapy.* 2013. V. 59. P. 181–191.
<https://doi.org/10.1159/000354156>
 12. *Reunov A.A., Reunov A.V., Pimenova E.A., et al.* Cucumarioside A₂-2 stimulates apoptotic necrosis in Ehrlich ascites carcinoma cells // *RAS Rep. Biol. Sci.* 2015. V. 462. P. 161–163.
<https://doi.org/10.1134/S0012496615020040>
 13. *Chaabane W., User S.D., El-Gazzah M., et al.* Autophagy, apoptosis, mitoptosis and necrosis: interdependence between those pathways and effects on cancer // *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 2013. V. 61. P. 43–58.
<https://doi.org/10.1007/s00005-012-0205-y>
 14. *Jangamreddy J.R., Los M.J.* Mitoptosis, a novel mitochondrial death mechanism leading predominantly to activation of autophagy // *Hepat. Mon.* 2012. V. 12. P. e6159.
<https://doi.org/10.5812/hepatmon.6159>
 15. *Lyamzaev K.G., Nepryakhina O.K., Saprunova V.B., et al.* Novel mechanism of elimination of malfunctioning mitochondria (mitoptosis): Formation of mitoptotic bodies and extrusion of mitochondrial material from the cell // *Biochim. Biophys. Acta.* 2008. V. 1777. P. 817–825.
<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2008.03.027>

AN UNUSUAL WAY OF MITOPTOSIS FOUND IN EHRlich CARCINOMA CELLS

**E. A. Pimenova^{a, #}, Y. A. Reunova^a, E. S. Menchinskaya^b,
A. A. Reunov^{a, c}, and Corresponding Member of the RAS D. L. Aminin^{b, d}**

^a *A.V. Zhirmunsky National Scientific Centre of Marine Biology, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russian Federation*

^b *G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch of Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russian Federation*

^c *St. Francis Xavier University, Antigonish, Nova Scotia, Canada*

^d *Kaohsiung Medical University, Kaohsiung, Taiwan*

[#] *e-mail: eapimenova@yandex.ru*

As a result of a complex microscopic study of the destruction of mouse Ehrlich ascites carcinoma (EAC) cells under starvation conditions, it was found that in addition to apoptosis, necrosis and apoptotic necrosis, already known for EAC, cell destruction can also occur by mitochondrial autolysis, which is proposed to be considered a new kind of mitoptosis. A feature of mitoptosis in EAC is the transformation of mitochondria into vacuoles, the fusion of which leads to rupture of the cell membrane and ejection of the nucleus from the cell. It is assumed that the polymorphism of EAC destruction patterns is explained by the different physiological state of the cells, which determines the “choice” of the mechanism of cell death. This situation poses a challenge for researchers to develop complex inducers with the ability to stimulate all possible types of cancer cell death.

Keywords: mouse Ehrlich ascites carcinoma, mitochondria, mitoptosis