

АННОТАЦИЯ

на диссертационную Досымбековой Раушан Сарсенбаевны на тему:
**«Ультраструктурная организация гепатоцитов и клеток
гепатокарциномы, резистентных к действию индукторов клеточной
гибели», представленной на соискание степени доктора
философии (PhD) по специальности 6D060700 – «Биология»**

Общая характеристика работы. В диссертационной работе были исследованы особенности ультраструктурной организации гепатоцитов и клеток гепатокарциномы в условиях *in vitro*, при действии карбоната лития

Актуальность исследования. Поиск вариантов повышения чувствительности опухолевых клеток, не только стволовых, но и остальных клеток популяции к воздействию индукторов клеточной гибели.

Одной из актуальных проблемы современной биологии и медицины является проблема индукции гибели раковой клетки. Известно, что опухоли могут обладать гетерогенностью клеточного состава (Wang K., et al., 2018).

Для опухолевой ткани в последнее время стали применять термин – раковые стволовые клетки, полагая, что эти клетки способны к длительному выживанию при различных терапевтических воздействиях и что именно они должны быть мишенями лекарственных препаратов (Marjanovic N.D., et al., 2013).

Гепатоцеллюлярная карцинома – рак печени, является одним из наиболее распространенных видов рака и второй ведущей причиной смертности от онкологических заболеваний во всем мире (Ladju R.B., et al., 2018).

Полагают, что развитие гепатокарциномы коррелирует с нарушением регуляции запрограммированной клеточной гибели (Degterev A., 2008). Считается, что в клетках гепатокарциномы могут развиваться некроз, апоптоз и аутофагия (Cui J., 2013). Некроз часто стимулирует местное и системное воспаление. Апоптоз и аутофагия не провоцируют воспаление, и поэтому их рассматривают как терапевтические мишени для лечения рака (Zhang, C., 2016). Показано, что карбонат лития, действуя через подавление активности ГСК-3 β и снижение экспрессии циклина E может вызывать остановку пролиферации за счет ареста клеточного цикла в фазе G2/M опухолевых клеток (Erdal E., et al., 2005, Tsui M. M., et al., 2012), а также индуцировать апоптоз опухолевых клеток (Li L., 2015). Появляются данные о том, что литий модулирует аутофагию в раковых клетках (O'Donovan T. R., et al., 2015).

В то же время отсутствуют данные о чувствительности нормальных клеток печени – гепатоцитов к воздействию различных доз карбоната лития, используемых для воздействия на злокачественные, трансформированные опухолевые клетки печени. Кроме того, при воздействии солей лития - индукторов клеточной гибели всегда остается жизнеспособной определенная

популяция клеток гепатокарциномы, дающая новый рост опухоли. Актуальным является выявление субклеточных механизмов резистентности клеток гепатокарциномы, способствующих их выживанию при воздействии повреждающего агента, и изучение структурной организации нормальных, неопухолевых клеток печени – гепатоцитов в этих условиях, что необходимо для разработки эффективной противоопухолевой терапии.

Цель исследования: выявить особенности ультраструктурной организации гепатоцитов и клеток гепатокарциномы при воздействии карбоната лития.

Задачи исследования:

1. С помощью световой микроскопии и морфометрии определить объемы гепатоцитов, их ядер и ядерно-цитоплазматическое соотношение изолированных гепатоцитов в динамике культивирования в стандартной культуральной среде и при добавлении карбоната лития.
2. При использовании проточной цитофлуориметрии оценить распределение гепатоцитов по фазам клеточного цикла при их культивировании в стандартной культуральной среде и при добавлении карбоната лития.
3. Исследовать ультраструктурную организацию гепатоцитов в динамике культивирования в стандартной культуральной среде и при добавлении карбоната лития.
4. Определить цитотоксичность карбоната лития на гепатоциты и клетки гепатокарциномы-29 при использовании МТТ-теста.
5. С помощью световой микроскопии и морфометрии определить объемы клеток гепатокарциномы-29, их ядер и ядерно-цитоплазматическое соотношение в динамике культивирования в стандартной культуральной среде и при добавлении карбоната лития.
6. При использовании проточной цитофлуориметрии оценить распределение клеток гепатокарциномы-29 по фазам клеточного цикла при их культивировании в стандартной культуральной среде и при добавлении карбоната лития.
7. Исследовать ультраструктурную организацию клеток гепатокарциномы-29 в динамике культивирования в стандартной культуральной среде и при добавлении карбоната лития.

Объект исследования. В экспериментах *in vitro* использованы культура мышинных гепатоцитов и клеточная линия мышинной гепатоцеллюлярной карциномы-29 (ГК-29).

Методы исследования: Культивирование клеток в условиях *in vitro*, МТТ-тест, проточная цитофлуориметрия CytoFlexS (Beckman Coulter, США), световой микроскоп LEICA DME” (Германия), трансмиссионный электронный микроскоп (JEM 1010, Япония), морфометрический анализ ImageJ (WayneRasband, США). и статистическая обработка данных, анализ Statistica 6.0 (StatSoft, США).

Научная новизна исследования.

Заключается в том, что впервые исследована ультраструктурная организация изолированных гепатоцитов и определен характер их внутриклеточных изменений в динамике их культивирования.

Впервые в условиях *in vitro* в сравнительном аспекте изучена ультраструктурная организация гепатоцитов при воздействии карбоната лития и способствовала развитию аутофагии и сохранению пролиферативной активности гепатоцитов.

Впервые проведено разделение гетерогенной по составу популяции клеток ГК-29 на типы по размерам и ядерно-цитоплазматическому соотношению в динамике их культивирования в питательной среде. Выявлены ультраструктурные особенности клеток в процессе их дифференцирования.

Научная значимость работы заключается в получении ранее неизвестных фактов о развитии базальной аутофагии в клетках гепатокарциномы IV и V стадий дифференцировки, которая является способом выживания опухолевых клеток.

Впервые выявлены процессы апоптоза и аутофагии в исследуемых клетках, что позволит определить роль этих процессов в выживании клеток ГК-29 и повысить клеточную гибель популяции клеток гепатокарциномы путем воздействия карбоната лития на резистентные клетки.

Впервые выявлено влияние карбоната лития на состояние неопухолевых клеток печени – гепатоцитов при использовании концентрации 5мМ карбоната лития, вызывающих деструктивные изменения в клетках гепатокарциномы.

Теоретическая значимость исследования:

Полученные результаты исследования позволят дополнить известные механизмы жизнеобеспечения и гибели клеток гепатоцеллюлярной карциномы при воздействии индукторов аутофагии. Выявленные процессы аутофагии в клетках гепатокарциномы и изолированных гепатоцитах расширят представления о механизмах макроаутофагии в клетках млекопитающих.

Влияние лития на ультраструктурную организацию клеток гепатокарциномы и гепатоцитов позволят выявить новые механизмы биологических эффектов лития.

Полученные данные о развитии аутофагии в клетках гепатокарциномы в условиях нормы и воздействия карбоната лития могут быть применены для сравнения эффективности разрабатываемых индукторов аутофагии.

Полученные данные свидетельствуют о вкладе аутофагии в процесс выживания первичной культуры гепатоцитов и могут быть использованы как показатель адекватности условий культивирования.

Практическая значимость исследования:

Практическое значение итогов работы заключается в том, что на основании выявленных ультраструктурных изменений клеток

гепатокарциномы при воздействии карбоната лития, возможна разработка подходов к таргетной терапии данного вида рака.

Разработанные морфологические критерии разделения клеток гепатокарциномы на типы в зависимости от их размеров и ядерно-цитоплазматического соотношения могут быть использованы для определения клеток-мишеней и эффективности различных лекарственных средств, разрабатываемых для противоопухолевой терапии.

Ультраструктурные особенности аутофагических структур в цитоплазме гепатоцитов и клетках гепатокарциномы могут быть использованы в курсе лекций по клеточной биологии, цитологии, гистологии.

Полученные результаты нашли практическое применение в лаборатории физиологии проектной системы НИИКЭЛ – филиала ИЦиГ СО РАН г.Новосибирска (Россия), в лаборатории физиологии лимфологической системы Института физиологии человека и животных КН МОН РК г.Алматы (Казахстан), внедрен в курс учебной программы КазНПУ им. Абая по дисциплинам «Клеточная биология» и «Биология клеток и тканей» для студентов специальности «5В060700-Биология».

Получена патент на полезную модель №2020/0105.2, по теме «Способ включения карбонат лития в культуру изолированных гепатоцитов» (19.06.2020г.)

Основные положения, выносимые на защиту

1. При культивировании изолированных гепатоцитов в стандартной среде происходит уменьшение объема клеток, возрастание ядерно-цитоплазматического соотношения, остановка клеточного цикла в стадии G_0/G_1 и развитие базальной аутофагии, с преобладанием гликофагии и митофагии.

2. Введение в культуру гепатоцитов карбоната лития в концентрации 5мМ в первичную культуру гепатоцитов не оказывает токсического действия на клетки, не блокирует клеточный цикл в G_0/G_1 стадии, не стимулирует апоптоз гепатоцитов, а способствует развитию аутофагии и сохранению пролиферативной активности гепатоцитов.

3. В процессе культивирования клеток гепатокарциномы -29 происходит возрастание объема клеток и их ядер, снижение ядерно-цитоплазматического соотношения и развитие базальной аутофагии, направленной на сохранение гомеостаза опухолевых клеток.

4. Введение карбоната лития в культуру клеток гепатокарциномы-29 в концентрации 5мМ приводит к остановке клеточного цикла в фазе G_2/M , нарушению ультраструктурной организации, индукции апоптоза и аутофагии в клетках ГК-29, что подтверждает потенциал лития как перспективного лекарственного средства для лечения ГЦК.

Личный вклад автора в работу: анализ литературных данных по исследуемой теме, определение целей и задач исследования, проведение экспериментальных исследований, статистическая обработка и анализ результатов, написание диссертации и оформление рукописи выполнены при личном участии автора.

Связь работы с научно-исследовательской программой.

Научная работа относится к индивидуально выполненной работе автора и не связана с финансируемыми научными проектами. Научно-исследовательская работа выполнена в филиале ИЦиГ НИИКЭЛ СО РАН (Новосибирск, Российская Федерация) по двустороннему соглашению №07-02-31/003 с Казахским национальным педагогическим университетом имени Абая от 02.11.2017г.

Апробация результатов исследования:

Основные результаты исследований были представлены и обсуждены на международных научных конференциях:

- на XIV Евразийский симпозиум, международной научно-практической конференции «Клеточная гетерогенность и аутофагия в популяции гепатокарциномы-29» (Киргизия, 2018);

- на XIII Международной научно-практической конференции «Лимфангиогенез и ангиогенез в условиях экспериментальной гепатокарциномы-29» (г. Новосибирск, Россия, 2018);

- на III Международной морфологической научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Структурная организация нефрона в условиях отдаленного опухолевого роста» (г.Новосибирск, Россия, 2018);

- на Международной научно-практической конференции молодых ученых «Структурно-функциональные изменения клеток гепатокарциномы-29 под влиянием лития» (г.Алматы, Казахстан, 2019);

- на Межвузовский международный конгресс Высшая школа: научные исследования «Базальная аутофагия в цитоплазме изолированных гепатоцитов в динамике культивирования» (г.Москва, Россия, 2021);

- на XV Евразийский симпозиум, международной научно-практической конференции «Ультраструктурное изменение при опухолевом росте и развитие аутофагии в почках и печени мышей линии СВА» (Киргизия, 2021).

Публикации по результатам исследования: По теме диссертации опубликовано 11 работ, из них 3 статьи в журналах, рекомендованных ККСОН МОН РК, 2 статья в международном научном издании, имеющей ненулевой импакт-фактор по информационной базе данных Scopus, 6 статей в материалах международных конференций.

Структура и объем работы по теме. Диссертация состоит из введения, четырех глав, заключения, выводов, списка использованной литературы и приложения. Общий объем рукописи – 123 страниц, включая 9 таблиц и 49 рисунка. Список использованной литературы включает 348 источников и 4 приложения.