

20 Преимущества и возможности флуоресцентных методов для визуализации апоптоза и аутофагии в опухолевых клетках человека *in vitro**

© Н.А. Наволокин¹, Н.В. Полуконова¹, Д.А. Мудрак¹, А.М. Мыльников¹, М.А. Барышникова², Д.А. Хоченков^{2,3,4}, А.Б. Бучарская¹, А.В. Полуконова¹, Г.Н. Маслякова¹

¹ ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ им В.И. Разумовского Минздрава РФ, 410012 Саратов, Россия

² НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, 115478 Москва, Россия

³ ФГБОУ ВО Тольяттинский государственный университет, 445020 Тольятти, Россия

⁴ ФНИЦ Кристаллография и фотоника РАН, 119333 Москва, Россия

e-mail: nik-navolokin@yandex.ru

Поступила в редакцию 15.12.2018 г.

В окончательной редакции 09.02.2019 г.

Принята к публикации 12.02.2019 г.

Исследованы возможности применения флуоресцентных методов исследования и их преимущества для визуализации и определения вида запрограммированной клеточной гибели опухолевых клеток человека под действием флавоноидов в экспериментах *in vitro*. Объектом исследования служили опухолевые клетки рака шейки матки HeLa и карциномы почки A498, для тестирования в экспериментах использовали флавоноидсодержащий экстракт аврана лекарственного (*Grafiolaofficinalis* L.). Использовали следующие флуоресцентные методы: тест „живые и мертвые“ с двойным окрашиванием — йодистым пропидием и акридиновым оранжевым, метод двойного окрашивания аннексином и йодистым пропидием. Подтверждение индукции аутофагии проводили с помощью клеточного анализатора Muse с флуоресцентными реагентами MuseAutophagy LC3-Antibody BasedKit. Применение флуоресцентных способов окраски с использованием двойного окрашивания акридиновым оранжевым и йодистым пропидием в тесте „живые и мертвые“ по сравнению с фазовой микроскопией дает возможность визуализировать процессы образования апоптотических телец и аутофагосом в клетках и, следовательно, может служить одним из методов скрининговой оценки эффективности различных химиопрепаратов.

DOI: 10.21883/OS.2019.06.47772.52-19

Введение

Флуоресцентные зонды и красители, которые используются для визуализации отдельных биологических компонентов, нашли широкое применение в биохимии и молекулярной биологии [1]. Так как биологические ткани, как правило, сами по себе флуоресцируют крайне слабо, метод флуоресцентной микроскопии с использованием флуоресцентных молекул (флуорофоров), способных специфически окрашивать разные структуры тканей и клеток, оказался очень ценным для биомедицинских исследований [1,2].

Необходимо отметить, что классические методы флуоресцентной микроскопии имеют более низкое разрешение по сравнению с электронной или атомно-силовой микроскопией. Однако в отличие от последних оптиче-

ская микроскопия позволяет наблюдать за внутренней микроструктурой клеток и даже небольших организмов, причем не только фиксированных, но и живых. Благодаря этому флуоресцентная микроскопия оказалась оптимальным методом для изучения механизмов функционирования организмов на клеточном, субклеточном и молекулярном уровнях [1,2].

Первым этапом поиска новых препаратов являются исследования *in vitro*, которые позволяют первичному скринингу быть максимально экономичным и эффективным [3]. В мировом научном сообществе методы *in vitro* популярны еще и с позиции гуманного обращения с животными [4]. В экспериментах *in vitro* широко используются флуоресцентные методы исследования из-за возможности визуализировать живые объекты. Для применения флуоресцентного метода *in vitro* нужны только раствор флуоресцентного соединения и соответствующий источник света для возбуждения, а основными приборами для изучения флуоресценции в лабораторных условиях являются спектрофлуориметры [5].

Наиболее приоритетным направлением исследований в клеточной биологии при разработке новых препа-

* The 22nd Annual Conference Saratov Fall Meeting 2018 (SFM'18): VI International Symposium „Optics and Biophotonics“ and XXII International School for Junior Scientists and Students on Optics, Laser Physics & Biophotonics, September 24–29, 2018, Saratov, Russia. <https://www.sgu.ru/structure/fiz/saratov-fall-meeting/previous-conferences/saratov-fall-meeting-2018>

ратов является изучение программируемой клеточной гибели (ПКГ), которая является основным механизмом элиминации из организма клеток как в норме, так и при различных патологических процессах. Исследования последних 30 лет в клеточной биологии, иммунологии и медицине привели к открытию различных типов ПКГ. Согласно последней классификации, выделяют 12 видов ПКГ, но к наиболее распространенным относят апоптоз, аутофагию, кератинизацию и некроз [6].

Одним из самых перспективных механизмов воздействия противоопухолевых препаратов считается активация ими механизмов апоптоза в клетках опухоли. Согласно морфологическому подходу, апоптоз — форма гибели клетки, при которой происходит конденсация хроматина с последующим образованием отдельных апоптотических телец, покрытых мембраной, без выхода содержимого клетки в окружающую среду. С биохимической точки зрения — это каскад взаимодействия различных каспаз (ферментов) [6]. Отличие апоптоза от некроза (непрограммируемой клеточной гибели), состоит в том, что при гибели клетки путем апоптоза не развивается интоксикация, т.е. клетка умирает без негативных последствий для окружающих клеток и для организма в целом.

Второй вид ПКГ, который все больше вызывает интерес в онкологии — аутофагия. При развитии аутофагии *de novo* формируются специализированные структуры — аутофагосомы. Это двухмембранные образования, внутри которых помещается клеточный материал (органелла или часть цитозоля), подлежащий разрушению. При слиянии аутофагосом с лизосомами образуются аутофаголизосомы, где и происходит расщепление подлежащих уничтожению компонентов клетки. Стимулами к запуску процессов аутофагии в неопухолевых клетках многоклеточных животных являются отсутствие факторов роста или нехватка питательных веществ, наличие в цитоплазме поврежденных органелл, например, митохондрий, пероксисом и т.д. [7].

Все методы морфологической идентификации ПКГ можно подразделить на следующие группы: рутинное микроскопическое исследование с использованием обычных методов фиксации и окрашивания или способов, селективно выявляющих пикнотизированный хроматин; флуоресцентно-микроскопическое исследование с использованием флуорохромов, включая и проточную цитометрию; электронно-микроскопические методы (трансмиссионная и сканирующая электронная микроскопия: выявление олигонуклеосомной деградации ДНК *in situ* и иммуногистохимическое выявление белков, участвующих в запуске ПКГ).

Флуоресцентные методы исследования обладают одним из самых широких спектров возможностей в клеточной биологии. Признаком ПКГ при использовании флуоресцентной микроскопии служит обнаружение ярко светящегося конденсированного хроматина. Для оценки количества живых, апоптотических и некротических клеток используют метод, основанный на двойном флуоресцентном окрашивании клеток аннексином V-FITC

и йодистым пропидием. Аннексин V специфично и с высокой афинностью связывается с фосфатидилсеринем, который появляется на поверхности апоптотических и некротических клеток. Йодистый пропидий проникает только в клетки с поврежденной мембраной. Апоптотические клетки окрашиваются только аннексином V, поскольку они сохраняют целостность мембраны на ранних стадиях апоптоза, в то время как некротические клетки окрашиваются и обоими реагентами [8].

По такому же принципу нами было предложено двойное окрашивание в луночных планшетах с использованием смеси йодида пропидия и акридинового оранжевого в условиях витальной окраски. Такой подход позволяет проводить количественный учет живых, некротизированных и подвергающихся апоптозу клеток и, кроме того, выявлять наличие аутофагосом.

Необходимо отметить, что более чувствительным методом является иммунофлуоресценция, однако ее недостатком является трудоемкость и высокая стоимость реагентов и оборудования. Сущность метода заключается в визуализации конкретного антигена при его взаимодействии со специфическими антителами с флуоресцентными маркерами.

Разработанный нами подход с использованием флуоресцентных методов для оценки ПКГ был апробирован в исследовании *in vitro* эффектов экстракта аврана лекарственного (*Gratiola officinalis* L.), содержащего флавоноиды. Флавоноиды являются одной из перспективных групп для разработки противоопухолевых препаратов из биологически активных веществ растительного происхождения. Наряду с безопасностью они обладают чрезвычайно широким спектром действия, кроме того, у них установлена и апоптотическая активность [9–12].

Цель исследования — установить возможности использования флуоресцентных методов и их преимущества по сравнению с фазовым контрастом для визуализации ПКГ опухолевых клеток человека и определения ее вида под действием флавоноидов в экспериментах *in vitro*.

Материалы и методы

Объектом исследования послужили опухолевые клетки рака шейки матки HeLa и карциномы почки A498, полученные из банка опухолевых культур РОНЦ им. Н.Н. Блохина.

В экспериментах *in vitro* использован экстракт аврана лекарственного (*Gratiola officinalis* L.), который наряду с низкой токсичностью обладает широким спектром действия: антиоксидантным [13,14], противоопухолевым [15–19], противомикробным и противовоспалительным [17,18]. Данный экстракт получен запатентованным нами способом [19,20]. Средство представляет собой упаренный экстракт желто-коричневого цвета, смешивается с водой и этиловым спиртом в любых соотношениях. Среднее значение кварцетина в данном

экстракте, определенное по градуировочному графику с использованием стандартного образца кверцетина (Sigma, 98%), составляет 0.66%; количество кверцетина в сухом остатке экстрактивных веществ (получаемого из 10 г сухой травы аврана), установленное методом жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), составило 350 μg . Подлинность экстракта аврана подтверждается качественными реакциями с кристаллическим магнием и реактивом Вагнера–Бушарда. Результат этих реакций говорит о наличии биофлавоноидов и отсутствии алкалоидов в полученном растворе.

Культивирование проводили в пластиковых флаконах в среде RPMI 4 (10% эмбриональной сыворотки, гентамицин, ампициллин, амфотерицин). Клетки культивировали в CO_2 -инкубаторе при 37°C в течение 24 h, после чего окрашивали. В качестве красителя использовали йодистый пропидий, проникающий в нежизнеспособные клетки за счет разрушения их мембраны [3]. Для визуализации клеток использовали микроскоп Leica DM1. Захват и анализ изображений проводили с помощью цифровой видеокамеры Leica DFC 420 C и программного обеспечения Leica Application Suite V 3.1. Для подсчета клеток использовали программное обеспечение ImageJ.

Для анализа цитотоксической, цитостатической и апоптотической активностей сравнивали в контрольной и экспериментальной группах следующие усредненные показатели: общее количество, количество живых и мертвых клеток в поле зрения, процентные соотношения живых и мертвых клеток, процент клеток, находящихся в состоянии апоптоза (пикноз, апоптотические тельца, хроматин в виде „серпов“), а также процент клеток, имеющих аутофаголизосомы от количества живых клеток в поле зрения.

Для описания морфофункциональных изменений в культуре опухолевых клеток HeLa под воздействием экстрактов применяли разные методы окрашивания, каждый из которых позволял решать определенные задачи. Так, применение одновременно двух флуоресцентных красителей — акридинового оранжевого и йодистого пропидия в тесте „живые и мертвые“ — позволяло выявлять общее количество клеток, погибших как путем некроза (окрашивались в красный цвет), так и путем апоптоза (зеленый цвет); количество клеток с аутофагосомами (появление темных вакуолей в цитоплазме), а также клеток, в которых запустился апоптоз, при этом выявлялись апоптотические тельца или пикноз ядра, также окрашенные в зеленый цвет. Параллельно проводилась микроскопия клеток в фазовом контрасте для подтверждения количества клеток в исследуемом поле зрения, которая обычно используется при окраске одним красителем.

Эксперименты в тесте „живые и мертвые“ при двойном окрашивании йодистым пропидием и акридиновым оранжевым проводили в культуральных планшетах: одна контрольная и пять экспериментальных лунок. Контролем служили клетки в питательной среде без добавления экстракта, выросшие в течение суток. В эксперименте

на культуре опухолевых клеток HeLa исследовались следующие концентрации экстракта аврана лекарственного (mg/ml): 0.035, 0.09, 0.18, 0.4, 0.9, 1.5, 3, 6. Тест проводился через 24, 48 и 72 h.

Подтверждали индукцию апоптоза методом двойного окрашивания аннексином и пропидием йодидом. Индукцию апоптоза исследовали после инкубации клеточных линий с экстрактом аврана в концентрации 0.88 mg/ml в течение 24 h. Исследование проводили с помощью Annexin-VFITCApoptosisKit (Invitrogen). Аннексин-V связывается с фосфотирилсеринем, выходящим на поверхность клеточной мембраны в ранней стадии апоптоза. Пропидий йодид (PI) связывается с ДНК разрушенных клеток и является маркером поздней стадии апоптоза или некроза.

Для постановки реакции клетки снимали, отмывали в PBS и ресуспендировали в аннексинсвязывающем буфере в количестве 10^6 cells/ml, затем переносили по 100 μl клеток в пробирки, содержащие 5 μl Annexin-V-FITC и 5 μl PI. Инкубировали при комнатной температуре в темноте 15 min. Добавляли 400 μl аннексинсвязывающего буфера, затем клетки считали на проточном цитофлуориметре (FACSCantoII, BecktonDickenson).

Подтверждение индукции аутофагии проводили на клеточной культуре раке почки A498 с помощью клеточного анализатора Muse (Merck-Millipore, Германия) с флуоресцентной системой детекции аутофагии с флуоресцентными реагентами MuseAutophagyLC3-AntibodyBasedKit. Клеточную линию карциномы A498 в течение 24 h обрабатывали экстрактом аврана в разных концентрациях при двукратном разведении, начиная от 3.6 mg/ml: 3.6, 1.8, 0.9, 0.45, 0.225, 0.113, 0.056, 0.028, 0.014, 0.007, 0.004 mg/ml. Результаты индукции оценивали при помощи клеточного анализатора Muse и методом конфокальной микроскопии при помощи InCellAnalyzer 6000 (GENhealthcare). Образование аутофагосом определяли при связывании антител к LC3B, конъюгированных с красителем AlexaFluor555 с рецептором на аутофагосомах. При наличии в клетках аутофагосом они флуоресцировали красным цветом, что свидетельствовало о положительной реакции на белок LC3B, ядра клеток окрашивались флуоресцентным красителем Hoechst33258 (Sigma) в синий цвет.

Электронную микроскопию проводили на электронном микроскопе LIBRA 120 „CarlZeiss“ (Германия) на базе ЦКП „Симбиоз“ ИБФРМ РАН. Пробы для электронной микроскопии готовили следующим образом: культуру клеток осаждали центрифугированием 7000 turns/min в течение 10 min и фиксировали 0.1%-глютаровым альдегидом, приготовленным на фосфатном буфере (0.1 M, pH 7.2) в течение минимум 1 h. Дальнейшую фиксацию проводили в 2.5%-глютаровым альдегиде, приготовленном на фосфатном буфере (0.1 M, pH 7.2) в течение 12 h (оставляли на ночь на дверце холодильника). Далее материал обрабатывался по стандартной методике, после чего образцы помещали в формочки для проведения полимеризации — культивировали в

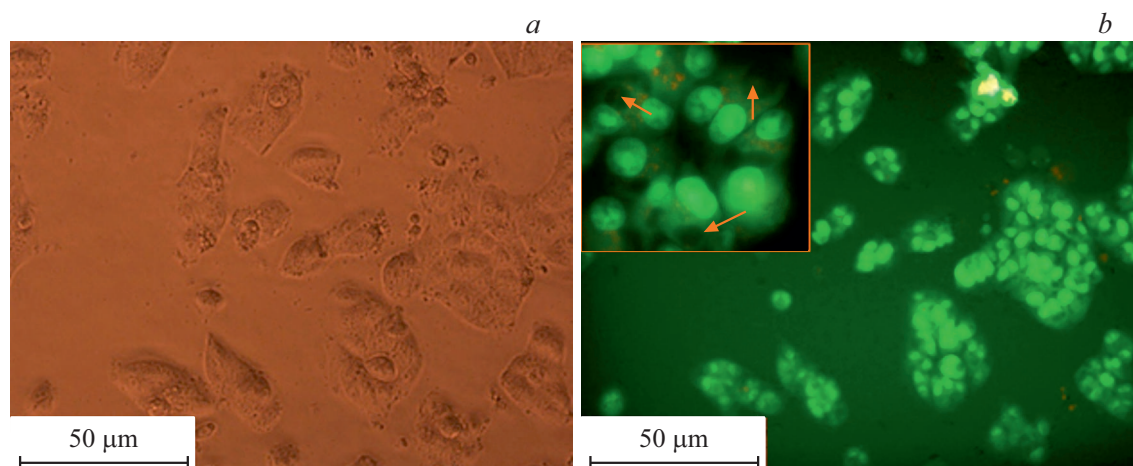


Рис. 1. Клетки культуры HeLa через 24 h после инкубации с экстрактом аврана в концентрации 0.18 mg/ml, появление аутофагосом: *a* — фазовый контраст, *b* — флуоресцентная окраска акридиновым оранжевым и йодистым пропидием. Стрелкой указаны аутофагосомы. Объектив $\times 20$.

течение первых суток при 37°C , вторых суток при 45°C , на третьи сутки при 57°C . Для проведения электронной микроскопии срезы наносили на никелевые сеточки с формваровой подложкой.

Для статистического анализа использовали программное обеспечение Microsoft Office Excel. Нормальность распределения показателей в группах была проверена при помощи критерия Шапиро–Уилка. Для сравнения полученных показателей с нормальным распределением был использован критерий Крамера–Уэлча (T), при котором разность средних арифметических двух выборок (контрольной и экспериментальной) делится на естественную оценку среднего квадратического отклонения этой разности. При данном методе отличия средних с вероятностью в 95% определяется при $T \geq 1.96$.

Возможности флуоресцентных красителей акридинового оранжевого и йодистого пропидия в тесте „живые и мертвые“

При низких концентрациях экстракта аврана (0.09 и 0.18 mg/ml) через 24 h после инкубации при фазовой микроскопии клетки имели полигональную форму (рис. 1, *a*). При флуоресцентной микроскопии было установлено, что активность ядрышковых организаторов сохранялась, количество ядрышек в ядре составляло от двух до трех. Среднее количество клеток (СКК) по сравнению с контролем при воздействии экстракта при 0.09–3 mg/ml сократилось в два раза, а при 6 mg/ml — в три раза, что свидетельствовало о высокой цитостатической активности экстракта. Процент мертвых клеток прямо пропорционально увеличивался, начиная от концентрации 0.18 mg/ml и выше (табл. 1), т.е. экстракт обладал и значительной цитотоксической активностью. Большинство погибших клеток находилось

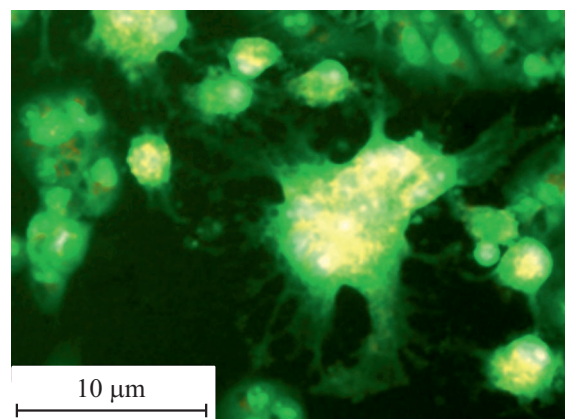


Рис. 2. Клетки культуры HeLa через 24 h после инкубации с экстрактом аврана в концентрации 0.09 mg/ml, флуоресцентная окраска акридиновым оранжевым и йодистым пропидием. Стрелками указаны цитоплазматические контакты между клетками. Объектив $\times 60$.

в состоянии пикноза, что говорит о высокой апоптотической активности экстракта. В диапазоне концентраций 3–6 mg/ml все клетки погибали, однако каким именно образом происходила гибель, определить было невозможно (рис. 1, *b*).

Максимальная активация аутофагии наблюдалась под действием экстракта в концентрации 0.09 и 0.18 mg/ml (табл. 1). Образование аутофагосом при 0.09 mg/ml свидетельствовало об активном действии экстракта на опухолевые клетки. Также при этой концентрации клетки образовывали конгломераты с выраженными цитоплазматическими контактами (рис. 2). При большей концентрации (0.18 mg/ml) образование конгломератов клеток и цитоплазматических контактов уже не обнаруживалось. Выявлена достаточно четкая тенденция: при резком уменьшении количества клеток с аутофагосо-

Таблица 1. Влияние экстракта аврана на клеточную культуру HeLa в течение 3 суток

Группа	Контроль	0.09 mg/ml	0.18 mg/ml	0.4 mg/ml	0.9 mg/ml	1.5 mg/ml	3 mg/ml	6 mg/ml
Через 24 h								
Количество клеток в поле зрения (СКК)	324 ± 32.3	163 ± 15*	168 ± 15*	161 ± 18*	133 ± 12*	123 ± 17*	132 ± 15*	95 ± 9*
Мертвые клетки в поле зрения, %	0 ± 0	0.4 ± 0.1*	2.8 ± 0.5*	8.4 ± 3*	13.2 ± 4*	41.2 ± 3*	97.6 ± 2*	93.6 ± 5*
Пикноз в поле зрения, %	0 ± 0	40 ± 9*	61 ± 8*	51.1 ± 5*	71 ± 11*	18 ± 1*	0 ± 0	0 ± 0
Количество клеток с аутофагосомами в сравнении с живыми, %	1 ± 1	96.5 ± 3*	99 ± 4*	19 ± 2*	0.3 ± 0.1*	0.3 ± 0.1*	0 ± 0	0 ± 0
Через 48 h								
Количество клеток в поле зрения	437 ± 41.8	284 ± 15*	231 ± 21*	228 ± 23*	205 ± 19*	136 ± 9*	90 ± 7*	86 ± 13*
Мертвые клетки в поле зрения, %	0 ± 0	0 ± 0	9 ± 2.4*	8 ± 1.7*	7.9*	21 ± 8.7*	99 ± 1*	99 ± 0.5*
Пикноз в поле зрения, %	0 ± 0	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.1	1 ± 1	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0 ± 0	0 ± 0
Количество клеток с аутофагосомами в сравнении с живыми, %	1 ± 1	16 ± 2*	23.6 ± 3*	12 ± 4*	89 ± 15*	1.7 ± 1	0 ± 0	0 ± 0
Через 72 h								
Количество клеток в поле зрения	484 ± 50	297 ± 31*	309 ± 29*	240 ± 21*	126 ± 11*	72 ± 5*	84 ± 7*	81 ± 9*
Мертвые клетки в поле зрения, %	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	14.8 ± 2.3*	76 ± 5.4*	100 ± 0*	100 ± 0*
Пикноз в поле зрения, %	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	1 ± 1	2 ± 0.1	1 ± 1	0 ± 0	0 ± 0
Количество клеток с аутофагосомами в сравнении с живыми, %	1 ± 1	7 ± 2*	37 ± 5*	93 ± 6*	82 ± 9*	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

Примечание. Указаны достоверные различия с контролем при $T > 1.96$ и $p < 0.05$.

мами резко увеличивалось количество мертвых клеток (табл. 1). Это, с нашей точки зрения, подтверждает роль аутофагии в качестве фактора, способствующего выживанию опухолевой клетки в условиях токсического стресса, формирующегося как вследствие образования большого количества постнекротических метаболитов, так и обусловленного влиянием противоопухолевой терапией.

При концентрациях экстракта выше 0/4 mg/ml при фазовой микроскопии клетки имели овальную форму, что свидетельствовало об уменьшении связи и откреплении клеток от подложки. Клетки лежали отдельными группами, не образуя монослоя (рис. 3, а). При оценке люминесцентного изображения при данной концентрации резко сократилось число клеток с аутофагосомами, а при 0.9 mg/ml аутофагосомы не образовывались. Количество ядрышек в ядре сократилось до одного, при этом наблюдалась их более слабая окраска, что свидетельствовало о снижении активности ядрышковых организаторов (рис. 3, с). Наблюдалась клетка с ярким свечением ядра, что свидетельствовало о конденсации хроматина и возможном запуске апоптоза, но апоптотических телец было немного (табл. 1).

При концентрации экстракта 1.5 mg/ml количество мертвых клеток было более 40%. Большинство клеток были откреплены от подложки. Активность ядрышковых организаторов отсутствовала. При концентрации экстракта 3 mg/ml практически все клетки были погибшими (рис. 4, б). Аутофаголизосомы отсутствовали. В небольшом количестве выявлены апоптотические тельца. При фазовой микроскопии все клетки имели округлую форму.

Через 48 h действия экстракта при концентрациях 0.09–0.4 mg/ml клетки при фазовой микроскопии имели полигональную форму и частично образовывали монослой (рис. 5, а–с), хотя по сравнению с контролем СКК было в 1.5–2 раза меньше (табл. 1). При двойном окрашивании флуоресцентными красителями выявили, что количество ядрышек в ядрах составляло 1–2. Более 16% клеток имели 1–2 аутофагосомы. Выявлены апоптотические тельца, но в небольшом количестве (табл. 1). Обнаружены клетки с аутофаголизосомами, ядро которых приобретало серповидную форму (рис. 5), что свидетельствовало о том, что дальнейшей судьбой клетки с аутофагосомой могла стать апоптотическая гибель.

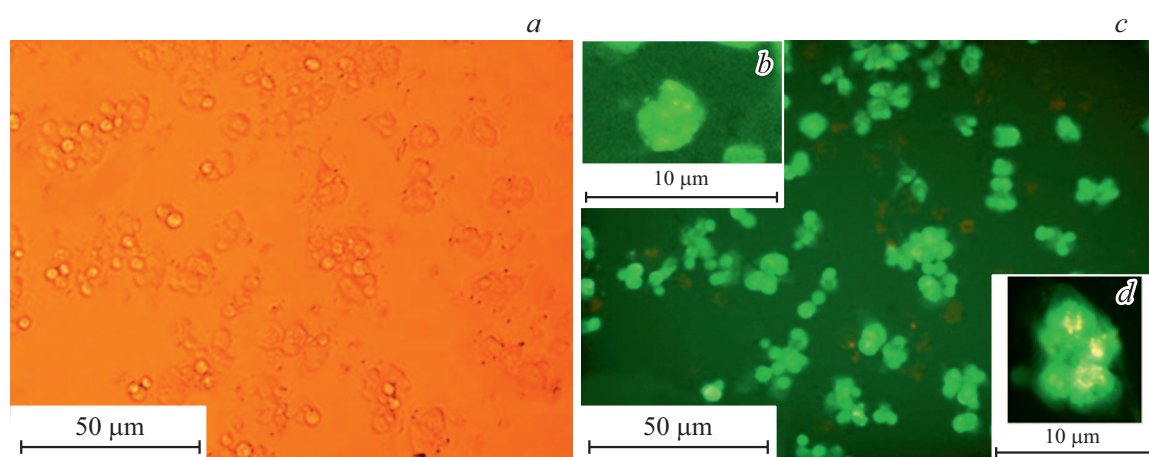


Рис. 3. Клетки культуры HeLa через 24 h после инкубации с экстрактом аврана в концентрации 0.8 mg/ml: *a* — фазовый контраст, *b* — флуоресцентная микроскопия, окраска акридиновым оранжевым и йодистым пропидием, *c* — апоптотические тельца, *d* — аутофагосомы. Объектив $\times 20$.

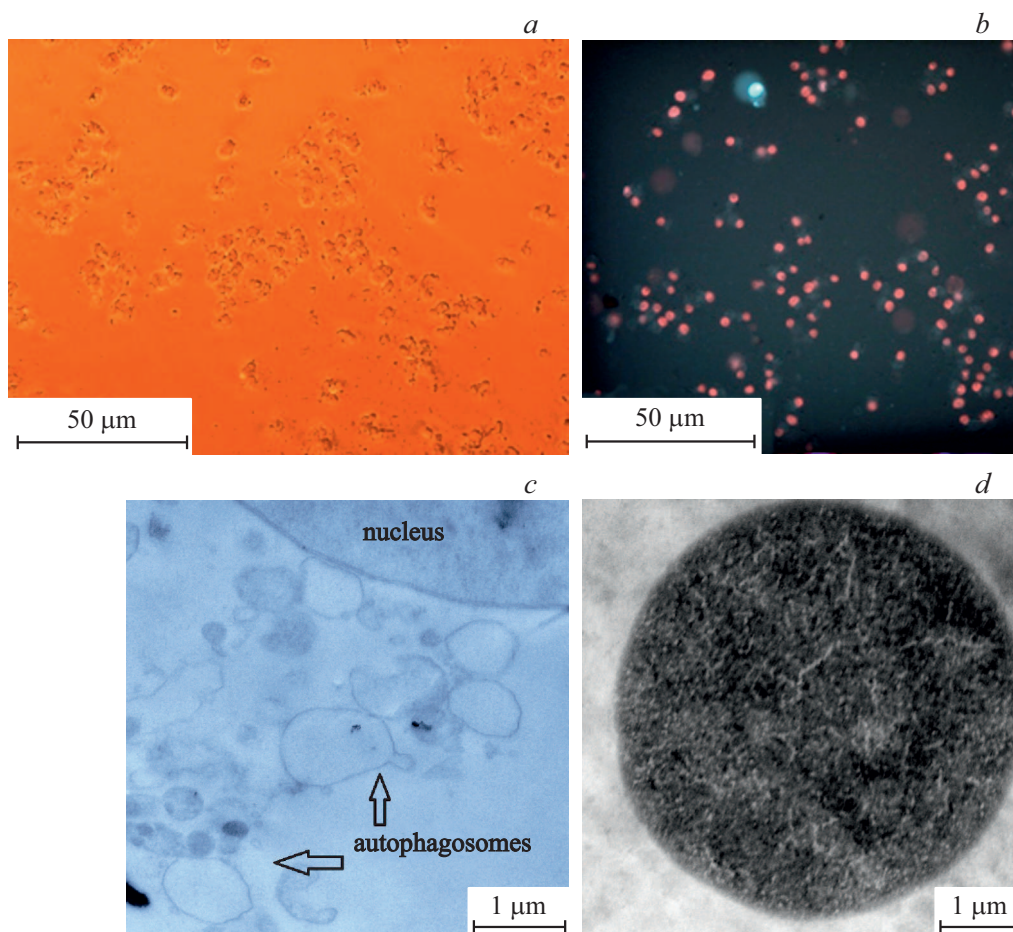


Рис. 4. Клетки культуры HeLa через 24 h после инкубации с экстрактом аврана в концентрации 3 mg/ml: *a* — фазовый контраст, *b* — флуоресцентная микроскопия, окраска акридиновым оранжевым и йодистым пропидием. Объектив $\times 20$. *c* — электронная микроскопия, концентрация экстракта аврана 0.4 mg/ml, появление вакуолей в клетки (аутофагосом), *d* — электронная микроскопия, концентрация экстракта аврана 3 mg/ml, конденсация ядерного хроматина (пикноз).

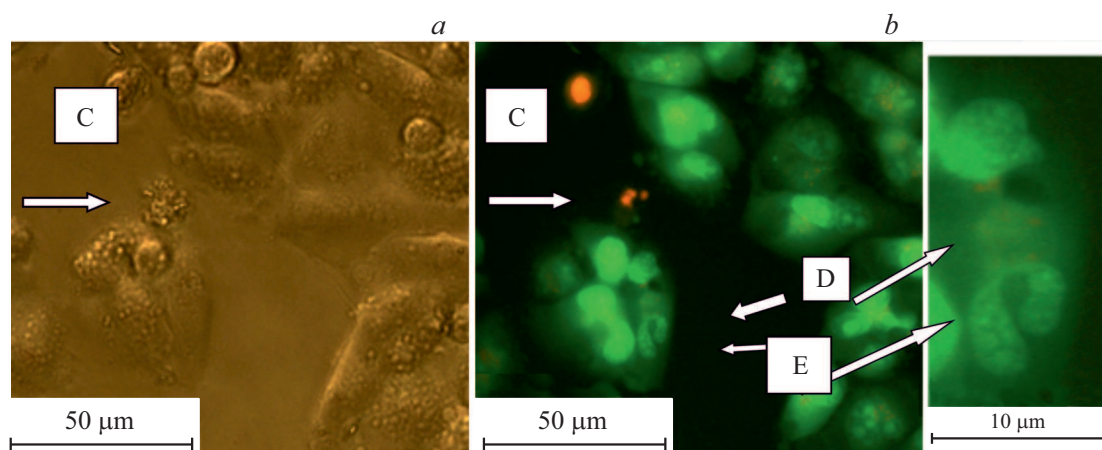


Рис. 5. Клетки культуры HeLa через 48 h после инкубации с экстрактом аврана в концентрации 0.18 mg/ml: *a* — фазовый контраст, *b* — флуоресцентная микроскопия, окраска акридиновым оранжевым и йодистым пропидием, *c* — мертвая клетка, *d* — аутофагосома, *e* — ядро еще живой клетки в виде серпа (предшествующая апоптотической гибели).

При концентрации экстракта 0.9 mg/ml при фазовой микроскопии клетки становились овальными. При двойном окрашивании флуоресцентными красителями выявили, что аутофагическая активность у клеток снизилась. Ядрышки были слабо окрашены. При 1.5 mg/ml клетки стали округлыми. При концентрациях 3 mg/ml и выше практически все клетки были погибшими.

Через 72 h действие экстракта было сходно с действием через 48 h, а именно, при концентрации экстракта 0.09–0.4 mg/ml клетки имели при фазовом контрасте полигональную форму и образовывали монослой, хотя по сравнению с контролем СКК было в 1.5–2 раза меньше (табл. 1).

При двойном окрашивании флуоресцентными красителями выявили, что количество ядрышек в ядрах 1–2. Количество мертвых клеток 2%. Клеток с аутофагосомами от 7 до 93%. Апоптотических телец мало (табл. 1). При концентрации 0.75 mg/ml клетки приобрели овальную форму, аутофагическая активность у них снизилась. Ядрышки были слабо окрашены. При концентрации 1.5 mg/ml клетки стали округлыми. Начиная с этой концентрации и выше, аутофагосом не образовывалось. При 3 mg/ml и выше почти все клетки были погибшими.

Появление в клетках аутофагосом, по нашему мнению, может являться морфологическим маркером развития резистентности опухолевых клеток к действию химиопрепаратов. Увеличение концентрации действующего вещества блокирует образование аутофагосом и приводит к гибели клеток и, следовательно, является одним из путей преодоления резистентности опухолей к терапии.

Таким образом, одновременное применение флуоресцентных красителей — акридинового оранжевого и йодистого пропидия позволяет в процессе скрининга препарата эффективно визуализировать аутофагосомы, пикноз, митоз и некроз. Это не позволяет сделать фазовый контраст, с помощью которого возможно опре-

делить только форму клеток и их количество, но нельзя судить о жизнеспособности клеток.

Апоптотическая активность в опухолевых клетках линии A498, выявляемая методом двойного окрашивания аннексином V и пропидием йодидом на проточном цитофлуориметре

Клеточную линию обрабатывали экстрактом аврана в концентрации 0.88 mg/ml. Аннексин V, меченый FITC, окрашивал клетки, находившиеся в раннем апоптозе. Двойное окрашивание аннексином и пропидием йодидом свидетельствовало о наличии позднего апоптоза (табл. 2).

В результате экстракт аврана проявил противоопухолевое действие в отношении опухолевых клеток человека линии A498. При этом при воздействии исследованной дозы экстракта аврана через сутки детектировали в основном клетки, находившиеся в позднем апоптозе (табл. 2). По-видимому, при воздействии экстракта в течение 24 h клетки данной клеточной линии уже проходят стадию раннего апоптоза.

Выявление маркера аутофагии — белка LC3B — с помощью флуоресцентного конъюгата антител в клетках карциномы почки человека A498

При исследовании внутриклеточной экспрессии белка LC3B при помощи конфокальной микроскопии и проточной цитометрии с помощью флуоресцентного конъюгата антител к LC3B из MuseAutophagyLC3-Antibody-BasedKit (Merck-Millipore) клетки приобретали тусклое красное свечение, когда происходило образование

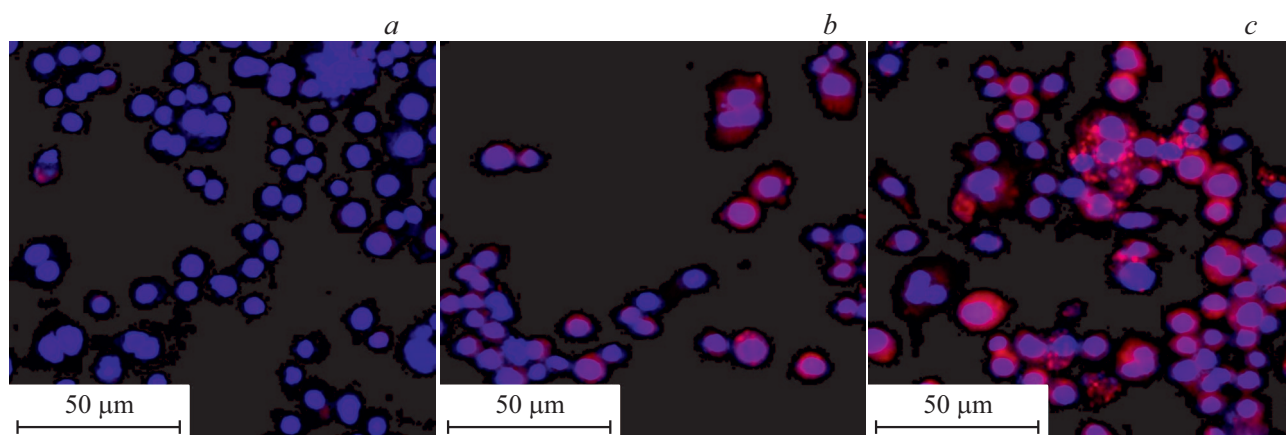


Рис. 6. Индукция аутофагии в клетках карциномы почки человека A498: *a* — контроль, *b* — при концентрации экстракта аврана 0.028 mg/ml, *c* — при концентрации экстракта аврана 0.056 mg/ml.

Таблица 2. Процентное распределение опухолевых клеток при воздействии экстракта аврана в концентрации 0.88 mg/ml по данным проточной цитофлуориметрии

Группа	Квадрат Q3, живые клетки (AnV ⁻ /PI ⁻), %	Квадрат Q4, ранние апоптотические клетки (AnV ⁺ /PI ⁻), %	Квадрат Q2, поздние апоптотические клетки (AnV ⁺ /PI ⁺), %	Квадрат Q1, некротические клетки (AnV ⁻ /PI ⁺), %
Контроль	82.9	3.8	12.2	1.1
Экстракт	2.1	6.4	89.5	2.0

аутофагосом, и ярко-алое свечение, когда аутофагосомы связывались с лизосомами и происходил процесс переваривания (рис. 6, *a-c*).

В контроле количество клеток, экспрессирующих LC3B, было равно 22.2. Начиная с концентрации экстракта 0.004 mg/ml, количество LC3B-позитивных клеток увеличивалось, достигая максимума (50.3) при концентрации 0.056 mg/ml, затем с дальнейшим увеличением концентрации экстракта аврана интенсивность аутофагии снова уменьшалась (табл. 3). При остальных концентрациях экстракта аврана аутофагия в клетках отсутствовала.

Обсуждение

Оценка возможностей флуоресцентных методов исследования по сравнению с фазовым контрастом показала, что даже при использовании простого двойного окрашивания акридиновым оранжевым и йодистым пропидием возможно проводить эффективный скрининг новых противоопухолевых препаратов с определением не только цитотоксической, цитостатической активности [21], но и цикла клетки (фазы митоза), количества ядрышек, наличия аутофагосом, пикноза, апоптоза и резистентности опухолевых клеток к лечению из-за развития в них аутофагии. Это было невозможно ранее при отдельном окрашивании одним или несколькими другими флуоресцентными красителями. С использованием фазового контраста возможно определить только

Таблица 3. Процентное распределение опухолевых клеток карциномы почки (A498) с аутофагосомами при воздействии экстракта аврана в течение 24 h по данным проточной цитофлуориметрии

Концентрация экстракта, mg/ml	Количество LC3B-позитивных клеток	Коэффициент индукции аутофагии	Общее количество клеток
3.6	24.3	1.1	447
1.8	27.4	1.2	479
0.9	25.8	1.2	431
0.45	28.5	1.3	585
0.225	25	1.1	605
0.113	29.5	1.3	707
0.056	50.3	2.3	694
0.028	31.1	1.4	699
0.014	25.5	1.2	683
0.007	27.8	1.3	657
0.004	25.8	1.2	649
Контроль	22.2	1	739

форму клеток и их количество, но нельзя оценить жизнеспособность и другие параметры клеток.

Возможность применения двойного окрашивания (акридиновым оранжевым и йодистым пропидием) для оценки ПКГ подтверждается и другими достоверными методами, такими как электронная микроскопия и иммунофлуоресценция, широкое использование которых

ограничено из-за трудоемкости и высокой стоимости проведения исследования.

Также преимуществом использования флуоресцентных методов исследования перед фазовым контрастом является способность установить наличие аутофагии как возможной причины резистентности к исследуемому лекарственному средству.

Аутофагия позволяет опухолевым клеткам выживать за счет избавления от поврежденных органелл и получения новых ресурсов для восстановления. Поэтому появление аутофагии при проведении химиотерапии может являться признаком резистентности опухолевых клеток, хотя на сегодняшний день нет единого мнения о их роли как фактора, способствующего опухолевого росту [21–24]. В отличие от общепринятого в клеточной биологии одиночного окрашивания флуоресцентным красителем предложенное нами двойное окрашивание в тесте „живые и мертвые“ (заявка на изобретение № 2018105465 от 13.02.18) продемонстрировало не только роль аутофагии в развитии резистентности опухолевых клеток, но дало возможность более эффективно проводить скрининг препаратов, способных подавлять такую резистентность. Кроме того, предложенное нами двойное окрашивание акридиновом оранжевым и йодистым пропидием позволяет помимо цитотоксического и цитостатического эффектов включать на этапе скрининга изучение влияния препаратов на апоптоз и аутофагию.

Таким образом, применение двойного окрашивания флуоресцентными красителями позволит использовать более дорогостоящий иммунофлуоресцентный способ только для подтверждения видов ПКГ после отбора в скрининге наиболее эффективных веществ, что оптимизирует и повысит качество проводимых исследований *in vitro* с помощью флуоресцентных методов исследования.

Выводы

Применение флуоресцентных способов окраски с использованием двойного окрашивания — акридинового оранжевого и йодистого пропидия — в тесте „живые и мертвые“ по сравнению с фазовой микроскопией позволяет эффективно визуализировать процессы образования апоптотических телец и аутофагосом в клетках и, следовательно, может служить одним из методов скрининговой оценки эффективности различных химиопрепаратов.

Финансирование работы

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-015-00298, а также в рамках государственного задания Минздрава России „Исследование экстрактов лекарственных растений, содержащих флавоноиды и их фракций с целью создания препаратов, обладающих противоопухолевой, антиоксидантной, антикахексической и другой активностью“.

Соблюдение этических стандартов

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] Векшин Н.Л. Флуоресцентная спектроскопия биополимеров. Пушино: Фотон-век, 2009. 168 с.
- [2] Степаненко О.В., Верхуша В.В., Кузнецова И.М., Тuroverov К.К. // Цитология. 2007. Т. 49, № 5. С. 395–420; Stepanenko O.V., Verkhusha V.V., Kuznetsova I.M., Turoverov K.K. // Tsitologiya. 2007. V. 49. N 5. P. 395–420.
- [3] Cassimeris L., Lingappa V.R., Plopper G. Lewin's Cells. Jones and Bartlett Publishers. 2011. 1056 p. Перевод: Кассимерис Л., Линганна В.Р., Плоннер Дж. Клетки по Льюину. М.: Лаборатория знаний, 2016. 1056 с.
- [4] Drummen G.P.C. // Molecules. 2012. V. 17. P. 14067–14090. doi 10.3390/molecules171214067
- [5] Udenfriend S. // Protein Science. 2015. V. 4. N 3. P. 542–551. doi 10.1002/pro.5560040321
- [6] Galluzzi L., Vitale I., Abrams J.M., Alnemri E.S., Baehrecke E.H., Blagosklonny M.V., Dawson T.M., Dawson V.L., El-Deiry W.S., Fulda S., Gottlieb E., Green D.R., Hengartner M.O., Kepp O., Knight R.A., Kumar S., Lipton S.A., Lu X., Madeo F., Malorni W., Mehlen P., Nuñez G., Peter M.E., Piacentini M., Rubinsztein D.C., Shi Y., Simon H-U, Vandenberghe P., White E., Yuan J., Zhivotovsky B., Melino G., Kroemer G. // Cell Death Diff. 2012. V. 19. N 1. P. 107–120. doi 10.5167/uzh-49281
- [7] Скибо Ю.В., Абрамова З.И. Методы исследования программируемой клеточной гибели: Учебно-методическое пособие для магистров по курсу „Теория апоптоза“. Казань: ФГАОУВПОКФУ, 2011. 61 с.
- [8] Polier G., Ding J., Konkimalla B.V., Eick D., Ribeiro N., Kuhler R., Giaisi M., Efferth T., Desaubry L., Krammer P.H., Li-Weber M. // Cell Death Dis. 2011. V. 2. N 7. P. e182. doi 10.1038/cddis.2011.66
- [9] Wang I.K., Lin-Shiau S.Y., Lin J.K. // Eur. J. Cancer. 1999. V. 35. N 10. P. 1517–25.
- [10] Tkachenko N., Pravdin A., Terentjuk G., Navolokin N., Kurchatova M., Polukonova N.V. // Proc. SPIE. 2015. V. 9448. P. 94480P. doi 10.1117/12.2179862
- [11] Tkachenko N.V., Bykova E.V., Pravdin A.B., Navolokin N.A., Polukonova N.V., Bucharskaja A.B. // Proc. SPIE. 2016. V. 9917. P. 99170L. doi 10.1117/12.2228291
- [12] Navolokin N.A., Polukonova N.V., Maslyakova G.N., Bucharskaya A.B., Durnova N.A. // Russ. Open Med. J. 2012. V. 1. P. 0203. doi 10.15275/rusomj.2012.0203
- [13] Navolokin N.A., Mudrak D.A., Bucharskaya A.B., Matveeva O.V., Tychina S.A., Polukonova N.V., Maslyakova G.N. // Russ. Open Med. J. 2017. V. 6. N 3. P. 304 doi 10.15275/rusomj.2017.0304

- [14] Наволокин Н.А., Ивлиев А.В., Мудрак Д.А., Афанасьева Г.А. // Эксперим. и клин. фармакология. 2017. Т. 80. № 10. С. 40–43; *Navolokin N.A., Ivlichev A.V., Mudrak D.A., Afanasjeva G.A.* // Eksperimental'naya i Klinicheskaya Farmakologiy. 2017. V. 80. N 10. P. 40–43. doi org/10.30906/0869-2092-2017-80-10-40-43
- [15] Наволокин Н.А., Мудрак Д.А., Полуконова Н.В., Тычина С.А., Корчаков Н.В., Бучарская А.Б., Маслякова Г.Н. // Сибирский онкологический журнал. 2015. Т. 15. № 1. С. 37–43. doi 10.21294/1814-4861-2016-15-1-37-43
- [16] Наволокин Н.А., Мудрак Д.А., Полуконова Н.В., Бучарская А.Б. // Эксперим. и клин. фармакология. 2017. Т. 80. № 6. С. 19–23; *Navolokin N.A., Mudrak D.A., Polukonova N.V., Bucharskaya A.B.* // Eksperimental'naya i Klinicheskaya Farmakologiy. 2017. V. 80. N 6. C. 19–23. doi org/10.30906/0869-2092-2017-80-6-19-23
- [17] Полуконова Н.В., Наволокин Н.А., Райкова С.В. // Эксперим. и клин. фармакология. 2015. Т. 78. № 1. С. 34–38; *Polukonova N.V., Navolokin N.A., Raykova S.V.* // Eksperimental'naya i Klinicheskaya Farmakologiy. 2015. V. 78. N 1. C. 34–38. doi org/10.30906/0869-2092-2015-78-1-34-38
- [18] Наволокин Н.А., Скворцова В.В., Полуконова Н.В., Манаенкова Е.В., Панкратова Л.Э., Курчатова М.Н., Маслякова Г.Н., Дурнова Н.А. // Эксперим. и клин. фармакология. 2015. Т. 78. № 4. С. 10?13; *Navolokin N.A., Skvortsova V.V., Polukonova N.V., Manaenkova E.V., Pankratova L.E., Kurchatova M.N., Maslyakova G.N., Durnova N.A.* // Eksperimental'naya i Klinicheskaya Farmakologiy. 2015. V. 78. P. 10–13. doi org/10.30906/0869-2092-2015-78-4-10-13
- [19] Полуконова А.В., Дурнова Н.А., Курчатова М.Н., Наволокин Н.А., Голиков А.Г. // Химия растительного сырья. 2013. № 4. С. 165–173. doi 10.14258/jcprm.1304165
- [20] *Polukonova N.V., Kurchatova M.N., Navolokin N.A., Bucharskaja A.B., Durnova N.A., Maslyarkova G.N.* // Russ. Open Med. J. 2014. V. 3. P. 0304. doi 10.15275/rusomj.2014.0304
- [21] *Polukonova N.V., Navolokin N.A., Bucharskaya A.B., Mudrak D.A., Baryshnikova M.A., Stepanova E.V., Solomko E.S., Polukonova A.V., Maslyakova G.N.* // Russ. Open Med. J. 2018. V. 7. P. e0402. doi 10.15275/rusomj.2018.0402
- [22] *Julka P.K., Doval D.C., Gupta S., Rath G.K.* // Br. J. Radiol. 2008. V. 81. P. 444–449. doi 10.1259/bjr/32785946
- [23] *Dokladny K., Nathaniel Zuhl M., Mandell M., Bhattacharya D., Schneider S., Deretic V., Moseley P.L.* // J. Biol. Chem. 2013. V. 288. P. 14959–14972. doi 10.1074/jbc.M113.462408
- [24] *Yang Z., Ghoorun R.A., Fan X., Wu P., Bai Y., Li J.* // Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol. 2015. V. 39. P. 98–106. doi 10.1016/j.clinre.2014.06.014