

КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
Институт фундаментальной медицины и биологии
Кафедра биохимии, биотехнологии и фармакологии

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ
ПРОГРАММИРУЕМОЙ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ
Учебное пособие



Скибо Ю.В., Абрамова З.И.

КАЗАНЬ
2023

Печатается по рекомендации учебно-методической комиссии Института фундаментальной медицины и биологии КФУ (Протокол № 8 от 28.06.2023 г.)

Составители: к.б.н., с.н.с. Скибо Ю.В., д.б.н., проф. Абрамова З.И.

Рецензент: проректор по научной и инновационной работе, зав. кафедрой биохимии и клинической лабораторной диагностики КГМУ, д.м.н., профессор **Мустафин И.Г.**

Скибо Ю.В., Абрамова З.И.

Методы исследования программируемой клеточной гибели: Учебное пособие, 2-е издание, дополненное /Ю.В. Скибо, З.И.Абрамова. - Казань: Изд-во Казан. ун-та, 2023.- 65 с.

В учебном пособии изложены основные положения лабораторных занятий по курсам «Молекулярные механизмы деления и гибели клеток» и «Программируемая клеточная гибель». Дана краткая история открытия и основные положения программируемой клеточной гибели: апоптоза, аутофагии и некроза. Описаны методы идентификации живых, апоптотических, аутофагических и некротических клеток.

Цель практикума – ознакомить студентов с современными методами изучения процессов программируемой клеточной гибели, обучить приемам и навыкам, необходимым в экспериментальной работе с клетками при определении их физиологической активности.

Предлагается несколько основных современных методов. Изложенный материал иллюстрируется примерами и рисунками.

Предназначено для студентов вузов, аспирантов и преподавателей.

© ФГАОУ ВПО "Казанский (Приволжский) федеральный университет",
2023

© Ю.В. Скибо,
© З.И. Абрамова

ВВЕДЕНИЕ

Гибель клеток является важным звеном нормального (физиологического) и патологического процесса. Среди различных типов клеточной гибели наиболее изученной формой является апоптоз. Установлены отличительные признаки различных этапов апоптоза с помощью световой и электронной микроскопии. Существуют различные серологические и микроскопические методы для обнаружения и изучения механизма гибели клеток, которые основаны на различных технологиях и отличаются специфичностью, чувствительностью, точностью и пропускной способностью.

Каждый из существующих методов разработан под определенные задачи, а некоторые со временем приобрели более общий характер. В результате к настоящему времени исследователям доступно множество протоколов для изучения гибели клеток. Тем не менее, ни один из этих методов сам по себе не является достаточным для доказательства гибели клеток, и всегда следует использовать комбинацию из различных методов. Методы верификации клеточной гибели могут быть улучшены за счет усовершенствования существующих методов, которые могут различать ранние и поздние стадии апоптоза, временные особенности апоптоза, вторичный некроз, могут обеспечивать качественный анализ и которые можно использовать для количественного определения, а также могут снизить вероятность ложноположительных и ложноотрицательных результатов. Чтобы проиллюстрировать участие одного и того же биологического явления, необходимо использовать по крайней мере два дополняющих друг друга, но методологически разных подхода. Сочетание флуорогенных анализов с цитофлуориметрией и/или тестированием на основе иммуофлуоресцентной микроскопии, например, может без сомнения подтвердить активацию каспазы. Однако, поскольку клеточная гибель очень разнообразна, сигнальные пути, ведущие к клеточной гибели, могут различаться даже в различных экспериментальных условиях. В результате каждый исследователь должен определить, какие биохимические параметры следует отслеживать для характеристики гибели клеток в зависимости от поставленных задач. Тем не менее, можно с большой уверенностью сказать, что в ближайшее время станет возможной точная интерпретация гибели клеток, ее форм и путей регуляции, поскольку постоянно совершенствуются методики, разрабатываются новые протоколы верификации процесса гибели клеток, что может привести к преодолению текущих проблем.

В данном пособии приведен обзор основных типов программированной клеточной гибели – апоптоза, аутофагии и некроза – и методов их верификации. Проведен сравнительный анализ с целью выделить наиболее

эффективные методы обнаружения гибели клеток, помогающие исследователям сделать надежный и разумный выбор среди доступных методов анализа.

Часть 1. Понятие и классификация программированной клеточной гибели

Для полноценного и правильного развития и морфогенеза в многоклеточном организме существуют различные пути гибели клеток, позволяющие контролировать количество клеток и удалять инфицированные, мутированные или поврежденные клетки (Penalosa, 2006).

Проблема исследования молекулярных механизмов гибели клетки стала в последние годы одной из самых трудных и актуальных проблем биологических наук (Bedoui, 2020). Трудность проблемы очевидна: несмотря на большое количество экспериментальных данных, до сих пор остаются не исследованными механизмы этого явления, не до конца выяснена регуляция апоптоза отдельных клеток в целостном многоклеточном организме.

Актуальность этой проблемы определяется взаимосвязью нарушения регуляции процесса программированной гибели клетки с большинством заболеваний (Galluzz, 2017; Gudipaty, 2018). Прямая связь гибели клеток и многих патологических состояний сегодня уже не вызывает сомнения, поэтому выявление конкретных механизмов нарушения ее регуляции при конкретных заболеваниях позволит определить этиологию и патогенез данных заболеваний. И как следствие этого - возможность коррекции нарушения регуляции программированной гибели клетки.

Гибель клеток классически подразделяется на две группы: регулируемая и нерегулируемая (Degterev, 2008). Первой формой регулируемой клеточной смерти, которая была охарактеризована и описана, стал апоптоз, названный так его авторами Kerr, Wyllie and Currie (Kerr, 1972). Апоптоз может быть инициирован как физиологическими, так и патологическими стимулами. В течение многих лет апоптоз считался единственной формой регулируемой гибели клеток, но проведенные исследования детального механизма апоптоза показали, что существует еще одна форма регулируемой гибели клеток. Аутофагия была описана как не апоптотический регулируемый механизм гибели клеток. Первоначально аутофагия была определена в дрожжах, *Dictyostelium*, *C. elegans* и в растениях как механизм выживания в стрессовых условиях (Levine, 2004). При нехватке питательных веществ, внутри клетки образуются аутофагические вакуоли, внутри которых происходит переваривание клеточных компонентов (органелл и макромолекул) для

получения необходимых энергии и метаболитов, поддерживая функционирование клетки (Debnath, 2023).

В качестве нерегулируемой гибели клеток выделяют некроз, который происходит в связи с острой гипоксией или в результате ишемического повреждения, инфаркта миокарда и инсульта, или экспозицией клеток в сверх-физиологических условиях, таких как механическая сила, тепло, холод и при проникновении через мембрану токсинов. Недавние исследования показали, что некроз также может иметь некоторые компоненты сигнальных путей, которые в конечном итоге приводят к гибели клеток, то есть некротическая гибель клеток может быть запрограммирована / регулируется при определенных обстоятельствах (Kim, 2019). К запрограммированным внутриклеточным событиям, специфичные для некротической гибели клеток, относят: ранние признаки митохондриальной дисфункции (производство АФК в митохондриях и набухание митохондрий), истощение АТФ, отсутствие Ca^{2+} гомеостаза, перинуклеарная кластеризация органелл, активация протеаз, таких как кальпаины и катепсины, лизосомальные разрывы, и в конечном итоге разрыв плазматической мембраны.

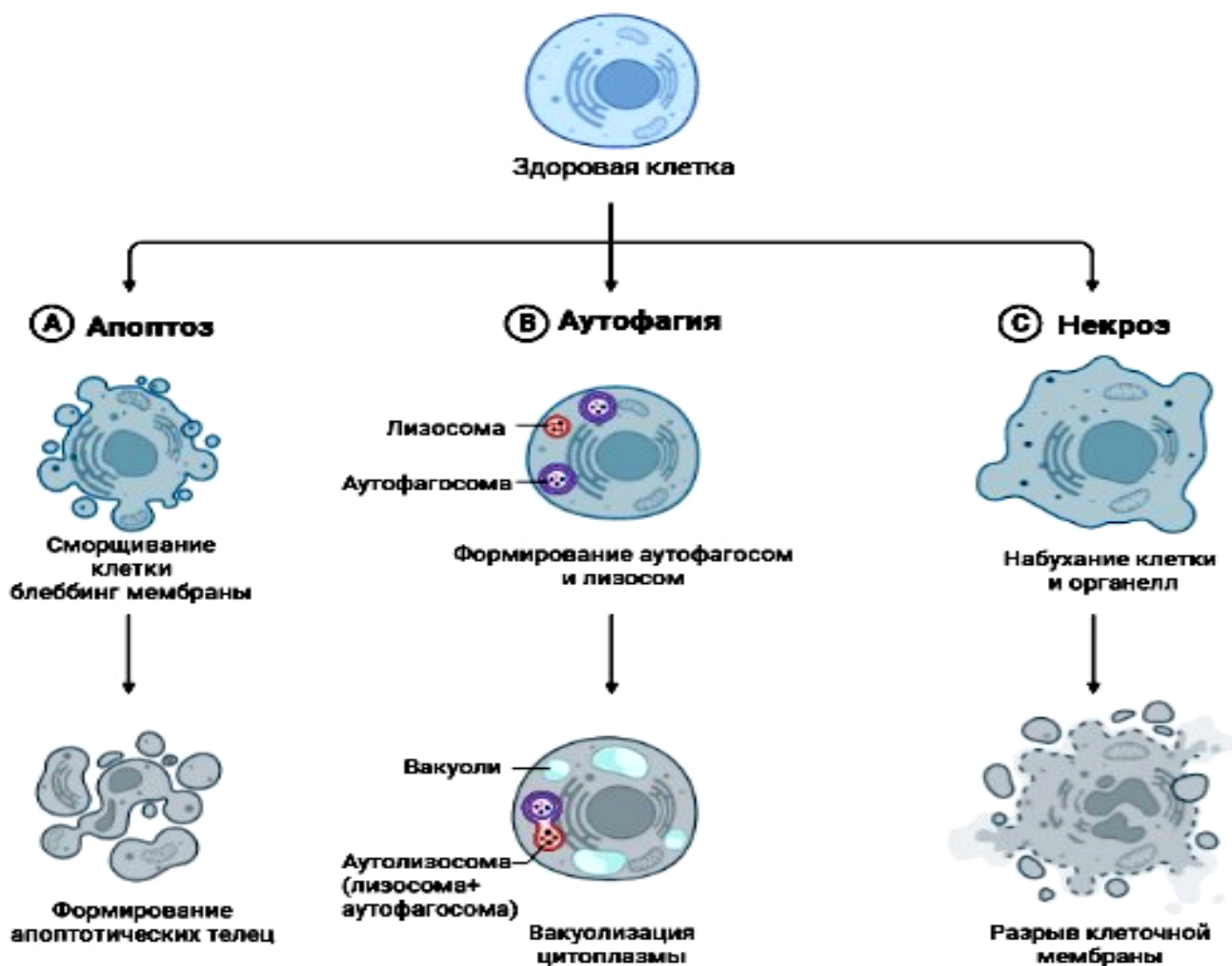


Рис. 1. Основные типы программированной клеточной гибели.

Таким образом, в составе программированной клеточной гибели (ПКГ) выделяют несколько типов: апоптоз, аутофагическую гибель и программированный некроз (рис. 1) (Galluzzi, 2018).

Программированная клеточная гибель по типу апоптоза

Программа апоптотической гибели состоит из следующих основных этапов (рис.1, 2): 1) индукция, или запуск программы апоптоза; 2) активация проапоптотических белков; 3) каскад каспаз, расщепляющих белки-мишени; 4) разрушение внутриклеточных органелл или их перестройка; 5) фрагментация клетки на апоптотические тельца; 6) подготовка клетки и ее фрагментов к фагоцитозу макрофагами или соседними клетками.

В запуске апоптоза участвуют различные органеллы, но, прежде всего это плазматическая мембрана и митохондрии (Vock, 2020; Bonora, 2022). Индукция апоптоза и активация проапоптотических белков ведет к активации каспаз (Kumar, 2023).

Различают инициаторные (8, 2, 10, 9) и эффекторные каспазы (3, 7, 6), т.е. каспазы функционируют как протеолитические каскады. Итогом работы эффекторных каспаз является разрушение множества белков, которые могут участвовать в поддержании гомеостаза и в репарации компонентов клетки, белков–регуляторов клеточного цикла, структурных белков и т.д. В результате действия эффекторных каспаз и активированных ими других ферментов (эндонуклеаз, гельзолина и т.д.) разрушаются такие компоненты клетки как внутриядерная ламина, нарушается целостность ДНК, происходит специфическая компактизация хроматина, наблюдается распад элементов цитоскелета, митохондрий, аппарата Гольджи, эндоплазматического ретикулума и т.д. Помимо каспазного в последние годы различают некаспазный механизм апоптотической гибели (Vock, 2020; Bonora, 2022), при котором происходит выход из митохондрий и миграция в ядро флавопротеина AIF и эндонуклеазы G, вызывающих распад ядерной ДНК на крупные фрагменты. Наблюдаемые при данном механизме конденсация хроматина и экспозиция фосфатидилсерина во внешнем монослое плазматической мембраны соответствуют признакам апоптоза.

Морфологические преобразования в процессе апоптоза выражаются в разной степени распада внутриклеточных компонентов (рис. 2). Конечными этапами апоптоза является уплотнение цитоплазмы, фрагментация ядер и самих клеток с образованием апоптотических телец, в которых могут быть фрагменты ядер, элементы аппарата Гольджи, митохондрии и т.д.



Рис. 2. Морфологические проявления апоптоза

Апоптотические клетки и тельца экспонируют на поверхности сигнальные и адгезивные молекулы, которые узнаются соседними клетками или макрофагами и способствуют фагоцитозу (Kourtzelis, 2020). К таким молекулам относятся фосфатидилсерин, лизофосфолипиды, витронектин, тромбоспондин и др. Процессу фагоцитоза способствует также инактивация на поверхности умирающих клеток молекул типа CD31, необходимых для распознавания не подлежащих поглощению жизнеспособных клеток.

Митотическая катастрофа. Понятие «митотической катастрофа» было введено для обозначения гибели клеток, в которых проявлялись признаки патологии митоза. Активно дискутируется вопрос о том, что следует называть митотической катастрофой. Согласно одним представлениям, митотическая катастрофа - это реализация апоптотической программы собственно в процессе митоза (Sazonova, 2021). При этом сегрегация хромосом отсутствует, и клетка блокируется в одной из фаз митоза. Как правило, блок происходит в так называемом К-митозе (колхицино-подобном митозе), когда в митотической клетке нарушены организация веретена и выстраивание хромосом в виде метафазной пластинки. Далее происходит активация каспаз и последующие деструктивные события по типу апоптотических.

Митохондриальный путь активации программы апоптоза считают преобладающим при гибели клеток собственно в митозе. Завершается апоптоз образованием апоптотических телец и их фагоцитозом. Вторым подтипом митотической катастрофы является гибель клеток, перешедших после аномального митоза в следующую G1-фазу без нормальной сегрегации хромосом и образования дочерних клеток, т.е. постмитотическая гибель полиплоидных клеток. При общей эуплоидности полиплоидной клетки ее отдельные ядра являются в основном анеуплоидными. Данный подтип митотической катастрофы может быть назван апоптозом клетки, прошедшей полиплоидизирующий митоз.

Причиной митотической катастрофы считают нарушение процессов контроля в клетках, в которых могли произойти повреждения ДНК или

нарушения сборки веретена (Sazonova, 2021). Ключевым моментом в блокировании клеточного цикла и в индукции в этих клетках апоптоза является экспрессия *p53*, который служит фактором транскрипции для *p21* – ингибитора G1–фазы клеточного цикла и для ряда проапоптотических белков. Митотическая катастрофа принципиально отличается от апоптоза тем, что нарушение ее программы может существенно повлиять на хромосомный состав клеток. Если в тетраплоидной клетке, возникшей в результате нарушения сегрегации хромосом, неактивны механизмы, ведущие к апоптозу или действующие в пункте проверки G1–фазы, то такая клетка может пройти очередной клеточный цикл и митоз.

Деление полиплоидных клеток часто сопровождается многополюсностью веретена, в результате чего после сегрегации хромосом могут возникать анеуплоидные клетки. Анеуплоидия может вести к отсутствию пунктов контроля пролиферации и нарушению механизмов гибели клеток. Клоны потомков таких клеток могут служить основой для трансформации клеток и роста опухолей. Появились данные, что изменение хромосомного состава диплоидных клеток может влиять на их способность вступать в апоптоз. Обнаружено, что если сестринские клетки, образовавшиеся в результате многополюсного митоза и являющиеся анеуплоидными, подвергнуть апоптотическому воздействию, погибает лишь часть таких клеток. Часть остаются жизнеспособными. Такие жизнеспособные анеуплоидные клетки можно рассматривать в качестве одного из этапов озлокачествления опухолей. Таким образом, преодоление именно митотического пункта проверки без нормализации состояния клетки (например, формирование многополюсного, а не биполярного веретена, образование микроядер) может быть источником клонов клеток, генетический состав которых, а значит, и их свойства, резко отличаются от исходных родительских клеток.

Программированная клеточная гибель по типу аутофагии

В качестве второго типа программированной гибели клеток в настоящее время выделяют гибель клеток, при которой в клетке запускается программа аутофагии (Feng, 2014; Mizushima, 2018; Yu, 2018; Levine, 2020). Аутофагия – это процесс деградации органелл и цитоплазматического материала, который происходит при участии внутриклеточных мембранных структур (рис. 3). При 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 клетках многоклеточных животных являются: 1) отсутствие факторов роста или нехватка питательных веществ; 2) наличие в цитоплазме поврежденных органелл, например, митохондрий, пероксисом и т.д.; 3) в клеточных культурах возникновение монослоя и существование контактного торможения.

При нехватке питательных соединений клетка начинает утилизировать часть своих цитозольных белков и органелл с помощью аутофагии. В результате при расщеплении этих компонентов в лизосомах или вакуолях в клетке поддерживается необходимый уровень тех соединений, которые нужны ей для жизнедеятельности.

При аутофагической гибели деятельность аутофагосом и лизосом ведет к тому, что в клетке перевариваются практически все мембранные органеллы. Активированные нуклеазы фрагментируют ДНК ядра, но не на олигонуклеосомные фрагменты, как это происходит при апоптозе. Аутофагический тип гибели называют также лизосомной клеточной смертью. Аутофагическая гибель отличается следующими признаками: 1) частичная конденсация хроматина; 2) иногда пикноз ядра; 3) отсутствие фрагментации ядра и клетки на поздних стадиях гибели; 4) отсутствие деградации ДНК до нуклеосомного уровня; 5) увеличение числа аутофагосом и аутофаголизосом; 6) увеличение лизосомной активности; 7) увеличение протяженности аппарата Гольджи и иногда расширение цистерн эндоплазматического ретикулума; 8) длительная сохранность микротрубочек и промежуточных филаментов; 9) иногда возрастание проницаемости митохондрий; 10) отсутствие активации каспаз. В конечном итоге остается клеточный дебрис – остаток клетки, окруженный плазматической мембраной, который фагоцитируется макрофагами (рис. 3).

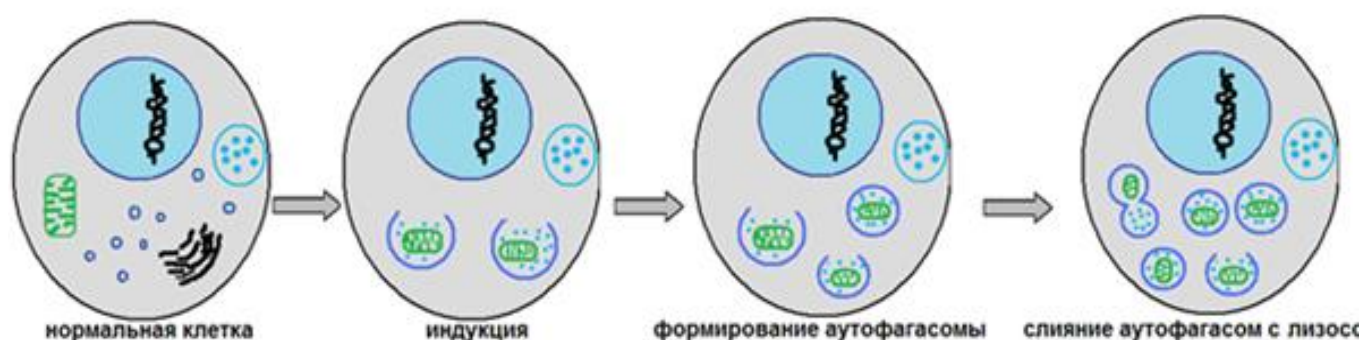


Рис. 3. Морфологические проявления аутофагии.

Этот повсеместный процесс выступает в качестве важного регуляторного механизма для ликвидации поврежденных органелл, внутриклеточных

патогенов и лишних частей цитоплазмы, а также долгоживущих, аномальных или агрегированных белков.

Описаны три различных типа аутофагии (рис.4), которые различаются в способе доставки органелл к лизосомам: макроаутофагия, микроаутофагия и шаперон-ассоциированная аутофагия. Наиболее подробно описывается тип макроаутофагии, в котором элементы цитоплазмы и целые органеллы поглощаются так называемыми аутофагосомами.

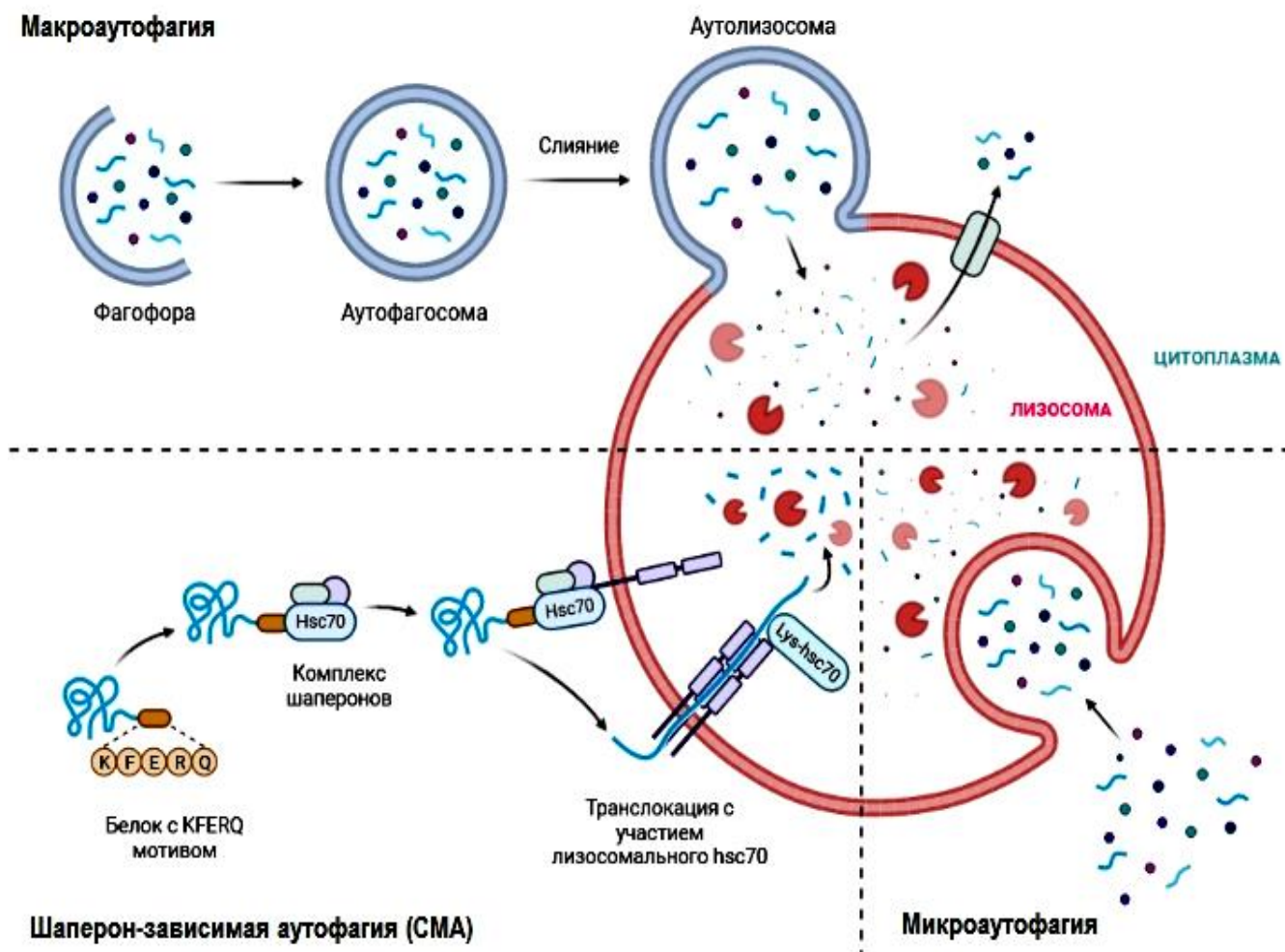


Рис.4. Основные типы аутофагии

Не так хорошо изученным является следующий тип аутофагии - микроаутофагия, при котором поглощение органелл производится непосредственно в лизосомные мембраны. Этот механизм также является путём деградации органелл и долгоживущих белков, но, в отличие от макроаутофагии, он не отвечает за адаптацию к недостатку питательных веществ. Одной из конкретных форм микроаутофагии является весьма избирательная деградация пероксисом, описанная в дрожжах, как механизм адаптации к оксидативному стрессу.

Третий тип самопоедания является шаперон-ассоциированная аутофагия (СМА). Несмотря на то, что этот путь также чувствителен к недостатку

питательных веществ, в нём не происходит тотального поглощения органелл или избирательного распознавания субстрата. В СМА, белки цитоплазмы, которые содержат конкретные пента-пептидные мотивы, распознаваемые лизосомами (консенсус последовательность KFERQ) распознаются комплексом белков-шаперонов (в том числе теплового шока 73 кДа-белок, hsc73) и направляются к лизосомной мембране, где они взаимодействуют с белками, связанными с мембраной лизосом (LAMP)2а. Субстратные белки затем разворачиваются и транспортируются в люмен лизосом для деградации.

Мотив KFERQ находится примерно в 30% белков цитоплазмы, включающих в том числе RNase A и амилоидные белки предшественники (APP). Интересно, что APP могут быть связаны hsc73 (и, следовательно, скормлены СМА), когда основной путь их деградации заингибирован и данное взаимодействие происходит не через APP KFFEQ последовательности. Пока еще не ясно как KFERQ мотив распознается шапероновым комплексом. Некоторые пост-трансляционные изменения субстратов (например, окисление или денатурация) могут сделать этот мотив более доступными для шаперонов, повышая уровень их лизосомного поглощения в СМА.

Последствия затухания процесса аутофагии в клетках обычно крайне тяжелы. Следствием нарушения процесса аутофагии бывают заболевания, которым подвержены индивиды преклонного возраста. Для развития таких заболеваний требуется не одно десятилетие. При болезни Альцгеймера вследствие нарушения процесса аутофагии в цитоплазме нейронов образуются агрегаты белка тау, а снаружи образуются β -амилоидные бляшки (Kerr, 2017). Во время болезни Паркинсона в нейронах накапливаются агрегаты альфа-синуклеина (Menzies, 2017; Mallucci, 2020). А при болезни Хантингтона в цитоплазме нейронов накапливается белок хантингтин. Другие заболевания связанные со старением – различные кардиомиопатии. Накопление в кардиомицитах мусора (митохондрий и липофусцина) приводит к нарушению функционирования этих клеток. Вообще при «нормальном» старении клеточный мусор тоже накапливается в цитоплазме клеток но с меньшей скоростью. Таким образом, такие патологии как болезнь Альцгеймера можно считать, грубо говоря, примером «ускоренного старения» отдельной ткани (Terman, 2007)

Регуляция аутофагии: основные участники процесса белок TOR и белок beclin-1 (рис.5). Клетка может принять решение активировать или ингибировать аутофагию под влиянием двух регуляторов. Мишень рапамицина TOR считается основным ингибитором аутофагии в то время как белок beclin-1 считается главным активатором аутофагии. Если в клетке нет

недостатка энергетических ресурсов а также под влиянием факторов роста то белок TOR находится в активном состоянии и процесс аутофагии заблокирован: клетка идет по Akt/mTOR пути.

Недостаток энергетических ресурсов и питательных веществ приводит к активации аутофагии в результате блокирования фактора TOR. Главным активатором аутофагии является белок beclin-1. Фактор TOR блокируется рапамицином, а также (через факторы SIRT) ресвератролом – веществом, содержащимся в красном вине.

Направления работы современных лабораторий сводятся к идентификации белков, влияющих на аутофагию (таких как, например, белок TOR1, beclin 1 и др.) и кодирующих их генов.

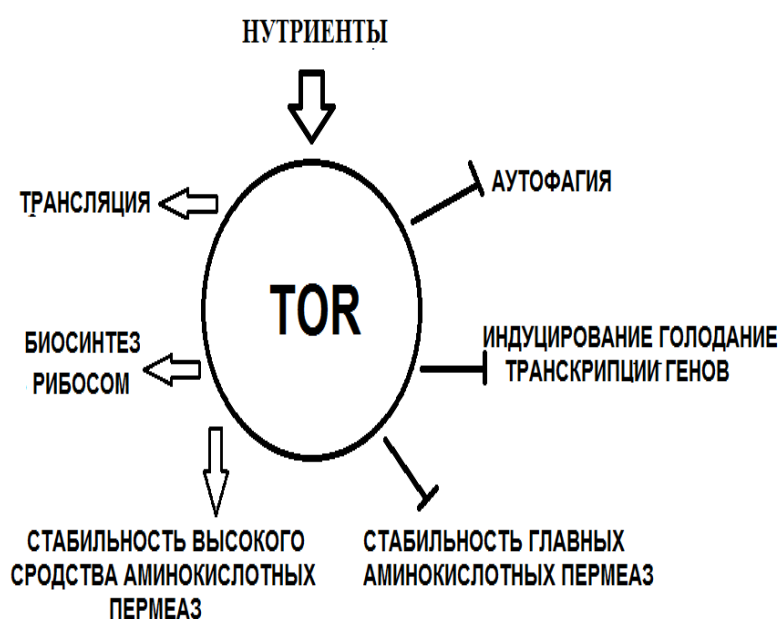


Рис. 5. Белки TOR ингибируют аутофагию и вызванную голоданием транскрипцию генов и активируют такие процессы как трансляция и биосинтез рибосом

Из статьи: (Raught B., Gingras A., Sonenberg N. Белки-мишени рапамицина (TOR) - The target of rapamycin (TOR) proteins //Proc Natl Acad Sci.- 2001.-V.98, №13.-P.7037–7044)

Кодирующие белки, отвечающие за аутофагию, гены Atg были идентифицированы у дрожжей. Сигнальные пути, которые управляются их производными сходны у дрозофил, млекопитающих, круглых червей. Зная, какие гены отвечают за аутофагию ученые могут избирательно «выключать» их у модельных организмов чтобы, например, исследовать влияние отсутствия таких генов на длительность жизни у генетически модифицированных организмов. К примеру было показано, что «выключение» отвечающих за аутофагию генов atg-7 и atg-12 с помощью интерферирующих РНК уменьшало продолжительность жизни *C.elegans* (Hars, 2007). А ингибирование фактора TOR который в свою очередь ингибирует аутофагию приводит к активации макроаутофагии и к увеличению продолжительности жизни подопытных животных. Гены, кодирующие белки отвечающие за аутофагию высоко консервативны, так что изучение регуляции аутофагии на таких модельных системах как *D.*

Melanogaster, *S. cerevisiae*, *C. elegans* может дать ключ к пониманию процессов регуляции аутофагии у высших млекопитающих. Открытая Кристианом де Дюве (в 1974 году он получил нобелевскую премию за ее открытие), сегодня аутофагия является предметом исследования генетиков, молекулярных биологов, биологов развития, нейробиологов (Mizushima, 2021; Klionsky, 2021).

Реакция организмов на аутофагию. В свою очередь уже известно, что различные организмы сходно реагируют на активацию аутофагии: *Микроорганизмы:* В ответ на голодание у дрожжей активируется аутофагия и увеличивается продолжительность жизни (Reggiori, 2013). Необходимая для аутофагии липаза Atg15p необходима и для увеличения длительности жизни. Аутофагия является причиной увеличения продолжительности жизни дрожжей с дефектным фактором TOR.

Дрозофилы: Ингибирование TOR приводит к увеличению продолжительности жизни и активации аутофагии. У дрозофил у которых нет генов регуляции аутофагии продолжительность жизни меньше в два раза чем у обычных мушек. При этом продолжительность жизни увеличивается если уровень белка активирующего аутофагию (Atg8a) увеличивается в стареющих клетках (Lőrincz, 2017).

Нематоды: У *C. elegans* путь TOR который отвечает за распознавание признаков «голодания» ингибируется при недостаточном питании (Palmisano, 2018). Инсулин/IGF-1 путь также ингибирует фактор TOR. Увеличение продолжительности жизни у мутантов нематод у которых замедлено дыхание в митохондриях также зависит от аутофагии. Кальциневрин также регулирует продолжительность жизни через аутофагию.

Программированная клеточная гибель по типу некроза

Длительное время некроз рассматривали лишь как вариант неспецифической гибели клетки. Фактической причиной гибели при некрозе считают резкое падение содержания АТФ в клетках до такого уровня, который не совместим с жизнью (Vanden Berghe, 2014; Wallach, 2016; Kim, 2019). «Энергетическая катастрофа» может быть вызвана, например, токсинами или физическими повреждениями. Морфологическими признаками некроза является набухание клеток и их мембранных органелл, неспецифическая компактизация хроматина, вакуолизация цитоплазмы, нарушение целостности плазматической мембраны и выход содержимого клеток во внеклеточное пространство. В итоге в многоклеточном организме в области некроза развивается воспалительная реакция.

Понятие «программированный некроз» сформировалось на основании данных о том, что существует сигнальный путь инициации некроза в ответ на связывание рецепторами таких молекул как TNF, на фоне подавления апоптоза. Индуцировать программу некроза можно, если активировать программу апоптоза связыванием таких лигандов как Fas, TRAIL или вызывая гиперэкспрессию проапоптотического белка Вах, и в тоже время либо ингибируя активность каспаз, либо вызывая гиперэкспрессию антиапоптотических белков. Программированный некроз в свою очередь может быть подавлен, если на клетки воздействовать антиоксидантами либо подавить активность протеинкиназы RIP (Fulda, 2016). Интересно, что протеинкиназа RIP является одной из мишеней действия каспаз. Это означает, что инициация и осуществление апоптоза активно подавляют развитие некроза в клетках.

Физиологическое значение такого противоборства между апоптозом и программированным некрозом проявляется на двух системах. На клетках, инфицированных вирусом *vaccinia virus*, программированный некроз может быть не только вариантом гибели в условиях подавления апоптоза, но и выполнять функцию усиления иммунных реакций в ответ на инфицирование микроорганизмами.

Отрицательная связь между апоптозом и программированным некрозом прослеживается и при повреждении ДНК, вызванном химическими агентами или ионизирующим излучением. В неопухолевых клетках в этих случаях включаются пункты проверки, действующие во всех фазах интерфазы клеточного цикла и предотвращающие вступление в митоз клеток с нарушенным геномом (Silva, 2010).

В случае нарушения механизмов репарации клетки погибают путем апоптоза. Однако, как оказалось, если в таких клетках с поврежденной ДНК нарушены механизмы осуществления апоптоза, что является достаточно распространенным в трансформированных клетках, клетки погибают путем программированного некроза. Физиологическое значение некроза в такой ситуации имеет двоякий смысл. С одной стороны программированная гибель клеток путем некроза в отсутствие апоптоза все же снижает риск передачи дочерним клеткам мутаций (Edinger, 2004). С другой стороны, распад клеток при некрозе может способствовать активации иммунного ответа многоклеточного организма.

Если проанализировать, в каких фазах клеточного цикла возможен тот или иной вариант гибели клеток, то складывается следующая картина. В отличие от апоптоза, который может запускаться в разных фазах клеточного цикла, в том числе и собственно в митозе в форме митотической катастрофы,

аутофагическая гибель развивается преимущественно в непролиферирующих клетках (G0-фаза и терминальная дифференцировка). Однако если в пролиферирующих клетках подавлены механизмы апоптоза, например, инактивированы каспазы, то гибель пролиферирующих клеток осуществляется по механизму программированного некроза.

Литература по теме:

1. *Bedoui S.* Emerging connectivity of programmed cell death pathways and its physiological implications/ Bedoui S, Herold MJ, Strasser A. // Nat Rev Mol Cell Biol. 2020;21:678–95.
2. *Bock FJ.* Mitochondria as multifaceted regulators of cell death / Bock FJ, Tait SWG // Nat Rev Mol Cell Biol. 2020;21:85–100.
3. *Bonora M.* Molecular mechanisms and consequences of mitochondrial permeability transition / Bonora M, Giorgi C, Pinton P. // Nat Rev Mol Cell Biol. 2022;23:266–85.
4. *Debnath J.* Autophagy and autophagy-related pathways in cancer / Debnath, J., Gammoh, N. & Ryan, K.M. // Nat Rev Mol Cell Biol (2023). <https://doi.org/10.1038/s41580-023-00585-z>.
5. *Degterev A.* Expansion and evolution of cell death programmes / Degterev A., Yuan J.// Nature reviews. Molecular cell biology. – 2008. – V. 9. – P: 378-390.
6. *Edinger A.Z.* Death by design: apoptosis, necrosis, and autophagy Curr. Opin / A.Z Edinger., C. Thompson . // Cell Biol.-2004.-Т.16.-С.663-669.
7. *Feng Y.* The machinery of macroautophagy / Feng Y, He D, Yao Z, Klionsky DJ. // Cell Res. 2014;24(1):24-41.
8. *Fulda S.* Regulation of necroptosis signaling and cell death by reactive oxygen species. Biol Chem. 2016;397:657–660.
9. *Galluzzi L.* Immunogenic cell death in cancer and infectious disease / Galluzzi L, Buqué A, Kepp O, Zitvogel L, Kroemer G. // Nat Rev Immunol. 2017;17:97–111.).
10. *Galluzzi L.* Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018 / Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, et al. // Cell Death Differ. 2018;25:486–541.
11. *Gudipaty SA.* Unconventional ways to live and die: cell death and survival in development, homeostasis, and disease / Gudipaty SA, Conner CM, Rosenblatt J, Montell DJ. // Annu Rev Cell Dev Biol. 2018;34:311–32.
12. *Hars ES.* Autophagy regulates ageing in *C. elegans*. / Hars ES, Qi H, Ryazanov AG, Jin S, Cai L, Hu C, Liu LF. // Autophagy. 2007 Mar-Apr;3(2):93-5. doi: 10.4161/auto.3636. Epub 2007 Mar 30. PMID: 17204841.
13. *Kerr JF.* Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics / Kerr J. F., Wyllie A. H., Currie A. R. // Br J Cancer. – 1972. – V. 26. – P: 239-257.

14. Kerr JS. Mitophagy and Alzheimer's disease: cellular and molecular mechanisms / Kerr JS, Adriaanse BA, Greig NH, et al. // *Trends Neurosci.* 2017;40(3):151-166.
15. Kim EH. Programmed Necrosis and Disease: We interrupt your regular programming to bring you necroinflammation / Kim EH, Wong SW, Martinez J. // *Cell Death Differ.* 2019 Jan;26(1):25-40. doi: 10.1038/s41418-018-0179-3).
16. Klionsky DJ. Autophagy in major human diseases / Klionsky DJ, Petroni G, Amaravadi RK, et al // *EMBO j.* 2021;40(19):e108863).
17. Kourtzelis I. Phagocytosis of Apoptotic Cells in Resolution of Inflammation / Kourtzelis I, Hajishengallis G and Chavakis T // *Front. Immunol.* 11:553. doi: 10.3389/fimmu.2020.00553).
18. Kumar S. The role of caspases as executioners of apoptosis / Kumar S, Dorstyn L, Lim Y. // *Biochem Soc Trans.* 2022;50:33–45. Vitale, I., Pietrocola, F., Guilbaud, E. et al. Apoptotic cell death in disease—Current understanding of the NCCD 2023. *Cell Death Differ* 30, 1097–1154 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41418-023-01153-w>.
19. Levine B. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy / B. Levine, D. J. Klionsky // *Dev Cell.* – 2004. – V.6. – P: 463-477.
20. Lőrincz P. Exploring Autophagy in *Drosophila* / Lőrincz P, Mauvezin C, Juhász G. // *Cells.* 2017 Jul 12;6(3):22. doi: 10.3390/cells6030022.
21. Mallucci GR. Developing therapies for neurodegenerative disorders: Insights from protein aggregation and cellular stress responses / Mallucci GR, Klenerman D, Rubinsztein DC // *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2020;36:165-189.
22. Menzies FM. Autophagy and neurodegeneration: Pathogenic mechanisms and therapeutic opportunities / Menzies FM, Fleming A, Caricasole A, et al. // *Neuron.* 2017;93(5):1015-1034.
23. Mizushima N. A brief history of autophagy from cell biology to physiology and disease. *Nat Cell Biol.* 2018;20(5):521-527.
24. Mizushima N. Autophagy in Human Diseases / Mizushima N, Levine B. // *N Engl J Med.* 2020;383(16):1564-1576).
25. Mizushima N. Breakthroughs and bottlenecks in autophagy research / Mizushima N, White E, Rubinsztein DC // *Trends Mol Med.* 2021;27(9):835-838.
26. Palmisano N.J. Autophagy in *C. elegans* development / N.J. Palmisano, A. Meléndez. // *Dev. Biol.* 2019 (447) pp. 103-125, 10.1016/j.ydbio.2018.04.009.
27. Reggiori F. Autophagic processes in yeast: mechanism, machinery and regulation / Reggiori F, Klionsky DJ. // *Genetics.* 2013 Jun;194(2):341-61. doi: 10.1534/genetics.112.149013.
28. Sazonova EV. A link between mitotic defects and mitotic catastrophe: detection and cell fate / Sazonova, E.V., Petrichuk, S.V., Kopeina, G.S. et al. // *Biol Direct* 16, 25 (2021). <https://doi.org/10.1186/s13062-021-00313-7>.

29. *Silva MT*. Secondary necrosis: the natural outcome of the complete apoptotic program. *FEBS Lett*. 2010;584:4491–4499.

30. *Yu L*. Autophagy pathway: cellular and molecular mechanisms / *Yu L, Chen Y, Tooze SA*. // *Autophagy*. 2018;14(2):207-215.

31. *Vanden Berghe T*. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways / *Vanden Berghe T, Linkermann A, Jouan-Lanhouet S, Walczak H, Vandenabeele P*. // *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15:135–147.

32. *Wallach D*. Programmed necrosis in inflammation: Toward identification of the effector molecules / *Wallach D, Kang T-B, Dillon CP, Green DR*. // *Science*. 2016;352:aaf2154–aaf2154.

Часть 2. Методы верификация программированной клеточной гибели.

Морфологические методы детекции ПКГ

Все методы морфологической идентификации ПКГ можно подразделить на следующие группы:

- рутинное свето-микроскопическое исследование с использованием обычных методов фиксации и окрашивания или способов, селективно выявляющих пикнотизированный хроматин. Сюда относятся методы с использованием витальных красителей;
- электронно-микроскопические методы: трансмиссионная и сканирующая электронная микроскопия;
- флуоресцентно-микроскопическое исследование с использованием флюорохромов.

Рутинная световая микроскопия. Изучение ПКГ на окрашенных стандартными способами препаратах широко применяется ввиду относительной простоты и дешевизны этих методов.

Для учета апоптоза в клеточной взвеси нередко используют подсчет апоптотических телец в камере Горяева—Тома с добавлением небольшого количества растворов витальных красителей — нейтрального красного или трипанового синего. Критериями отличия апоптоза от некроза выступают распад клеток на фрагменты, содержащие гранулярные взвешивания красителя и не имеющие диффузного прокрашивания цитоплазмы. *В отличие от некроза, при апоптозе мембранные структуры клеток остаются неповрежденными (т.е. фактически апоптотические тельца являются «функционирующими» образованиями),* это препятствует распространению красителя в цитозоле. Низкая эффективность метода связана с незначительной длительностью специфичной для апоптоза стадии

фрагментации клеток (всего 1-1,5 ч), а также с трудностями изучения морфологии погибающих клеток и апоптотических телец даже при применении фазового контраста.

Оценку апоптоза проводят и на фиксированных препаратах-мазках и гистологических срезах. Методика фиксации особого значения не имеет, но предпочтительнее смеси, сохраняющие тонкую структуру ядра клетки. Обычно для мазков применяют этанол или метанол, а для срезов - смеси Карнуа, Боуэна, растворы формалина. Для окраски используют стандартные методы — азур-эозин по Романовскому-Гимзе, гематоксилин-эозин и т.д. В связи с тем, что при апоптозе характерными считаются изменения морфологии ядра, некоторые авторы предпочитают использовать селективные методики окраски хроматина. Например, для выявления апоптотических изменений в миелокариоцитах костного мозга при лучевой болезни использовалась традиционная окраска на ДНК по Фельгену-Россенбеку. В. Moser предложил специальный метод выявления апоптоза селективной импрегнацией конденсированного хроматина $AgNO_3$ с этенамином на эмпирически подобранных условиях. Этот метод использовался для выявления апоптоза в спленоцитах и саркоматозных перевиваемых опухолях, причем возможно производить количественную оценку апоптоза с помощью автоматического компьютерного анализа изображения (Хавинсон, 2000).

Критерии апоптоза, выявляемые на рутинно-окрашенных препаратах. Следует обращать внимание на следующие изменения морфологии ядра:

1. *Маргинация хроматина.* Признак, который не всегда удается бесспорно выявить на окрашенных обзорными методами препаратах. Сущность его заключается в концентрации хроматина по периферии ядра в виде полусфер или глыбок, иногда принимающих форму полумесяца (Белушкина, 2001).

2. *Неровность контуров ядра.* Ядро на определенной стадии апоптоза приобретает лопастный вид, далее происходит его коллапси распад на микроядра.

3. *Пикноз (конденсация) хроматина.* Несмотря на то, что этому признаку отводится ведущая роль при верификации апоптоза, его специфичность признается далеко не всеми исследователями. Одни авторы относят кариопикноз, как и кариорексис, к процессам, характерным только для апоптотической гибели клеток, другие указывают, что аналогичные явления имеют место и при некрозе.

Цитоплазматические изменения менее характерны для апоптоза. Обычно таковыми считаются:

1. *Изменение окрашивания цитоплазмы*, это появление базофилии на ранних стадиях апоптоза (гибнущие клетки) или эозинофилии на поздних стадиях (апоптотические тельца). Такие изменения связывают, с одной стороны, с сохранением синтеза белка при апоптозе, а с другой - с увеличением активности транскляминазы, которое приводит к сгущению цитоплазмы. Эти биохимические признаки отличают апоптоз от некроза, однако их морфологическое выражение - изменение окраски цитоплазмы - не является характерным для ПКГ, поскольку изменения их могут быть связаны с состоянием метаболизма клетки и обычно используются лишь как дополнительный критерий.

2. *Вакуолизация цитоплазмы*, причиной которой является дилатация гладкой эндоплазматической сети (ЭПС). Это явление характерно для ранней стадии апоптоза, но, несмотря на его постоянство, малоприсгодно для верификации апоптотической смерти клеток, так как данная фаза апоптоза весьма кратковременна. Физиологически вакуолизация цитоплазмы при апоптозе обусловлена выведением из цитоплазмы жидкости, что необходимо для ее компактизации при действии транскляминазы.

3. *Изменение контуров и фрагментация клеток*. На ранних стадиях апоптоза наблюдается округление контуров и уменьшение размеров клеток, потеря ими межклеточных контактов. Далее на клеточной поверхности появляются вдавления и выпячивания, после чего клетка распадается на апоптотические тельца. Эти тельца существуют от нескольких минут до 1 ч. *In vivo* их элиминация сопряжена с рецептор-зависимым фагоцитозом макрофагами или окружающими паренхиматозными клетками.

Если фагоцитоз почему-либо не происходит (что имеет место *in vitro*), то апоптотические тельца подвергаются вторичным некротическим изменениям, обращаясь в детрит, что затрудняет их верификацию и количественный учет. На гистологических препаратах, где сохранена топография тканевых структур, дополнительным критерием служит отсутствие воспалительной реакции, а также то обстоятельство, что апоптотические процессы всегда разворачиваются на уровне индивидуальных клеток. Имеются указания на то, что на срезах апоптотические изменения могут проявляться в виде так называемых темных клеток (Бережков, 1990).

Итак, при апоптозе клетка сморщивается, теряя в течение нескольких минут до 1/3 своего объема (рис. 6А). “Усыхание” хорошо выражено как в культуре клеток, так и в тканевых срезах, где апоптотическая клетка отделяется от соседних клеток. Хроматин, который в норме представлен

открытыми и конденсированными областями (гетеро- и эухроматин), становится суперконденсированным, принимает форму полумесяца (подковы) по периферии ядра (рис. 6В). Вследствие активации семейства белков, именуемых каспазами начинаются процессы протеолиза, приводящие к гидролизу структурных белков клетки.

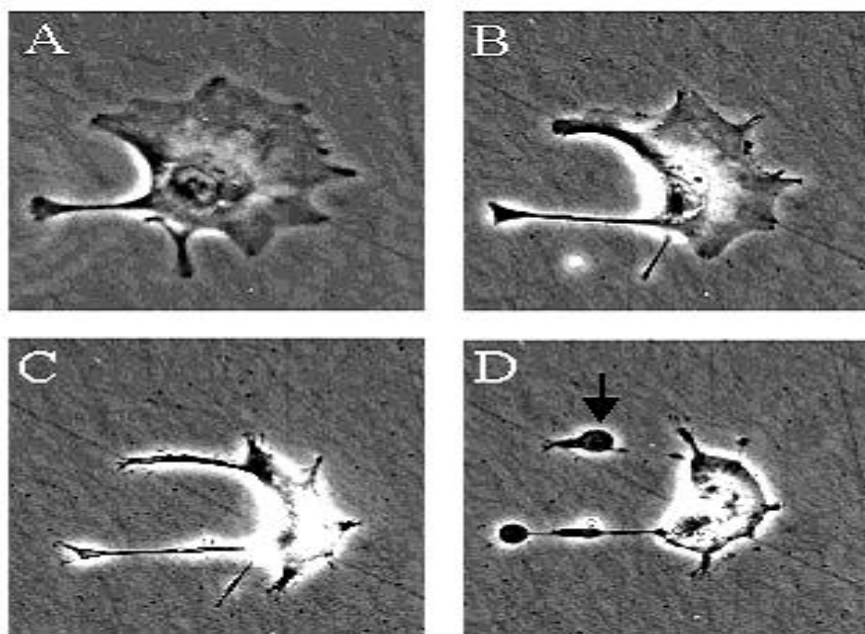


Рис. 6. Этапы апоптоза трофобластической клетки.

Стрелкой обозначено апоптотическое тельце. * фотогафия выполнена Nitric Oxide Research Group, St George's hospital medical School, University of London.

Клетки продолжают сокращаться (рис. 6С), принимая форму, удобную для фагоцитирования их макрофагами (или соседними клетками). Последние, в свою очередь, ответственны за удаление апоптотических клеток из тканей крайне «деликатным» способом. Изменения на уровне мембран клеток могут наблюдаться морфологически в виде появления специфических мембранных выпячиваний (рис. 6D) или пузырей, которые часто завершают апоптотический процесс. Небольшие пузырьки часто называют «апоптотическими тельцами» (рис. 6D, стрелка). Далее апоптотические тельца утилизируются посредством фагоцитоза, содержимое клетки не попадает во внеклеточную среду и не вызывает воспалительных явлений.

Микроскопические признаки некроза. При микроморфологическом исследовании в разрушающейся ткани выявляются характерные изменения, возникающие как в клетках (изменения ядра и цитоплазмы), так и в межклеточном веществе. Основным микроскопическим признаком некроза является кари́олиз (отсутствие ядер в поражённых клетках). Вокруг разрушенной ткани формируется воспаление (демаркационное воспаление).

Изменения ядер клеток. Ранние дегенеративные изменения сопровождаются уменьшением ядра и его гиперхромией (кариопикно́з). Последующие изменения зависят от механизма клеточной гибели. Онкоз сопровождается гидратацией нуклеоплазмы и увеличением ядра, которое в тканевых срезах выглядит светлым за счёт отёка (набухание ядра). Изменения ядра клетки при некрозе завершаются его распадом, фрагментацией (кариорéксис). Полное разрушение ядра обозначается термином «кариолíзис» (карио́лиз).

Изменения цитоплазмы. Изменения цитоплазмы зависят от формы гибели клеток. Апоптоз сопровождается уплотнением цитоплазмы вследствие дегидратации матрикса (коагуляция цитоплазмы), цитоплазма при этом окрашивается более интенсивно, объём её уменьшается. При пассивной гибели клетки, напротив, развивается прогрессирующий отёк (гидратация) гиалоплазмы и матрикса органелл. Гидратация цитоплазматических структур паренхиматозных клеток в патологии обозначается термином «гидропíческая дистрофия», а резко выраженный отёк органелл (эндоплазматической сети, митохондрий, элементов комплекса Гольджи и т. п.) называется «баллонной дистрофией», или «фокальным колликвационным некрозом клетки». Фрагментацию («глыбчатый распад») цитоплазмы принято обозначать термином «плазморéксис», однако в полной мере плазморексис развивается только при апоптозе (фаза образования апоптозных телец). Разрушение цитоплазмы называется плазмолíзисом (плазмóлизом).

Изменения межклеточных структур. При некрозе разрушаются также структуры экстрацеллюлярного матрикса (основное вещество и волокна). Наиболее быстро деполимеризуются протеогликаны (основное вещество волокнистой соединительной ткани), длительное всего разрушаются ретикулярные (ретикулиновые) волокна. Коллагеновые волокна сначала увеличиваются за счёт отёка (набухают), затем разволокняются (разделяются на более тонкие нити) и разрушаются (коллагенóлиз). Эластические волокна распадаются на отдельные фрагменты (эласторéксис), после чего разрушаются (эластóлиз).

Электронная микроскопия. Большинство электронно-микроскопических признаков апоптотической смерти клеток составляют те же изменения, которые выявляются при световой микроскопии. Ведущее значение аналогично придается морфологии ядерных структур. Вместе с этим существует ряд более тонких ультраструктурных изменений, характеризующих апоптотическую гибель и отличающих ее от некроза. В

первую очередь к ним относятся изменения цитолеммы и поверхностных структур клетки (рис. 7).

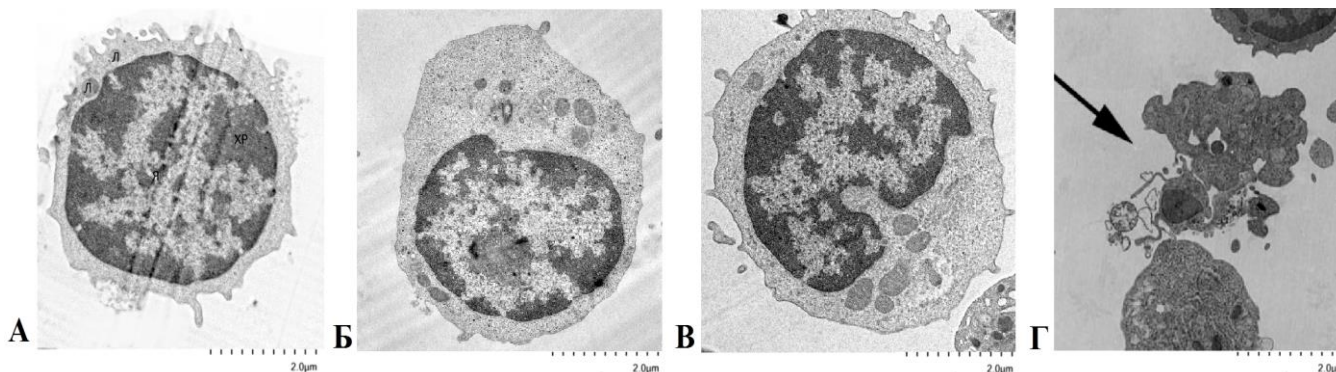


Рис. 7. Примеры микрофотографий клеток с морфологическими признаками апоптоза, выявляемые методом трансмиссионной электронной микроскопией: А - нормальная клетка; Б - апоптотическая клетка на ранней стадии процесса; В - апоптотическая клетка на поздней стадии процесса; Г - образование апоптотических телец.

Вначале происходит утрата микроворсинок и десмосом, затем появляются выпячивания и пузыри на мембране, получившие в англоязычной литературе название блеббингов. При этом сама цитоплазматическая мембрана и мембраны органелл остаются неповрежденными вплоть до фагоцитоза. Митохондрии не набухают, рибосомы концентрируются в кристаллоидные структуры, под мембраной появляются параллельные пучки филаментов. В ядре обнаруживаются транскрипционные комплексы, поступающие из ядрышек и формирующие осмиофильные тельца. Пory сохраняются лишь в тех участках оболочки ядра, где отсутствует маргинация хроматина. Эндоплазматический ретикулум после кратковременной дилатации образует контакты с плазмолеммой, далее каналцы гранулярного ретикулума формируют кластеры и фрагментируются. В целом электронная микроскопия считается более надежным способом выявления апоптоза по сравнению со световой.

Процесс аутофагии характеризуется рядом морфологических проявлений: на ранних стадиях происходит формирование большого количества аутофагосом, снижается число митохондрий и уменьшается площадь мембранных структур эндоплазматического ретикулума, аппарат Гольджи увеличивается в размерах, возможен усиленный эндоцитоз (рис. 8). В дальнейшем наблюдается нарастание числа аутофагосом, многие из которых содержат включения липидов. Возможна конденсация ядра, однако это происходит не всегда.

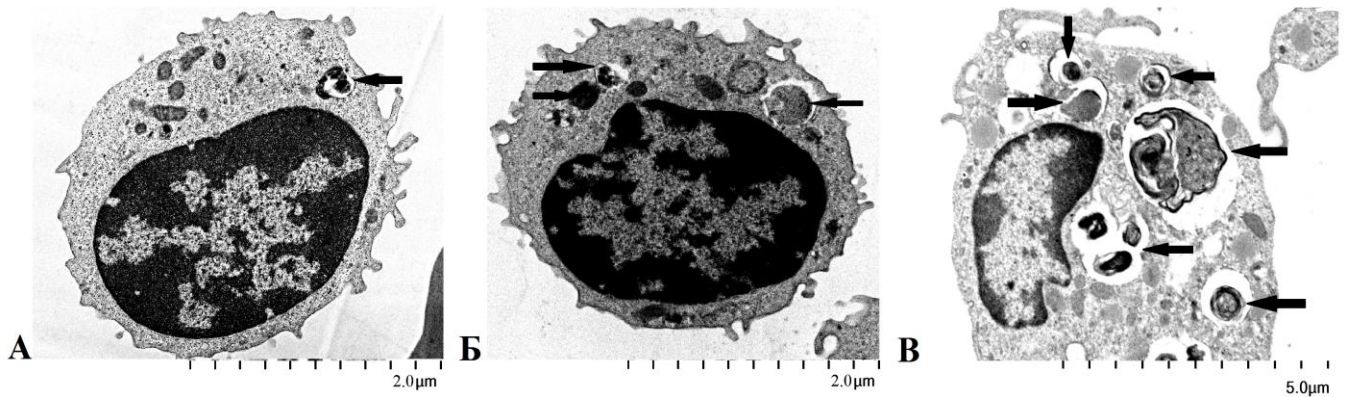


Рис. 8. Примеры микрофотографий клеток с морфологическими признаками аутофагии, выявляемые методом трансмиссионной электронной микроскопией: А - нормальная клетка с единичной аутофагосомой; Б, В – нарастание количества и размера аутофагосом в клетке (стрелки).

Микроскопические признаки некроза выявляются лишь на поздних стадиях процесса на фоне аутолиза. Ранние стадии некроза можно выявить лишь с использованием специальных методов, таких как поляризационная и люминесцентная микроскопия с окраской акридиновым оранжевым, гистохимических методик и (ШИК-реакция) и электронной микроскопии.

Ультраструктурные признаки некроза отражают изменения в ядре, митохондриях, полисомах, лизосомах, цитоплазматической сети клетки.

- Ядро. Агрегация хроматина, фрагментация фибрилл, полное разрушение.

- Митохондрии. Набухание, уменьшение плотности матрикса, образование в нём агрегатов неправильной формы, отложение солей кальция.

- Цитоплазматическая сеть. Набухание, фрагментация и распад мембранных структур.

- Полисомы и рибосомы. Распад полисом, отделение рибосом от поверхности цистерн эндоплазматической системы, уменьшение размеров и количества рибосом.

- Лизосомы. Агрегация гранул матрикса и его просветление, разрыв мембран.

- Цитоплазматический матрикс. Исчезновение гранул гликогена, снижение активности ферментов.

Микроскопические признаки некроза выявляются в изменениях ядра, цитоплазмы клеток. Изменения ядер связаны с активацией гидролаз (рибонуклеаз и дезоксирибонуклеаз). Ядра последовательно подвергаются сморщиванию (кариопикноз), распаду на глыбки (кариорексис) и лизируются (кариолизис, см. рис. 9). В цитоплазме происходит денатурация и коагуляция

белков, сменяемая обычно колликвацией. Коагуляция цитоплазмы, сменяется распадом её на глыбки (плазмореक्सис) и лизисом органелл (плазмоллизис).

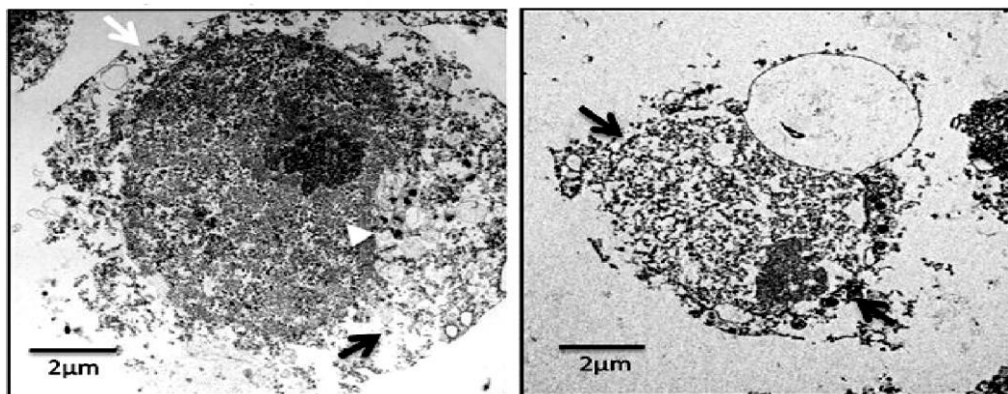


Рис. 9. Микрофотографии клеток с морфологическими признаками некроза, выявляемые методом трансмиссионной электронной микроскопией. Первичный некроз, показывающий потерю целостности мембраны (белая стрелка) и низкую плотность цитоплазмы (черная стрелка). Все еще можно наблюдать высокое содержание ДНК (белая стрелка).

НОРМАЛЬНАЯ КЛЕТКА	АПОПТОЗ	АУТОФАГИЯ	НЕКРОЗ
ОСОБЕННОСТИ КЛЕТочНОЙ ГИБЕЛИ	АПОПТОЗ (ПКГ I)	АУТОФАГИЯ (ПКГ II)	НЕКРОЗ
МОРФОЛОГИЯ	УМЕНЬШЕНИЕ ОБЪЕМА КЛЕТКИ	КРУПНЫЕ ВАКУОЛИ	НАБУХАНИЕ КЛЕТКИ
КОНДЕНСАЦИЯ ХРОМАТИНА	++	+	-
ВАКУОЛИЗАЦИЯ (АУТОФАГОСОМЫ)	-	++	+
ЭКСТЕРНАЛИЗАЦИЯ ФОСФАТИДИЛСЕРИНА	++	+	-
АКТИВАЦИЯ КАСПАЗ	++	-	-
ПРОЦЕССИНГ LC3 БЕЛКА	-	++	-

Рис. 10. Особенности апоптотической, аутофагической и некротической гибели клеток. Электронно-микроскопические микрофотографии нормальных, аутофагических, апоптотических и некротических клеток. В таблице указаны основные морфологические и молекулярные особенности для каждого типа гибели клеток.

В то время как морфологические признаки апоптоза хорошо определены, различие между некротической и аутофагической гибелью менее однозначны. Биоэнергетическая катастрофа, кульминацией которой является клеточный некроз, также стимулирует аутофагию, поскольку клетка пытается скорректировать снижение уровня АТФ путем катаболизма составляющих ее молекул. Таким образом, вакуолизация цитоплазмы наблюдается как в аутофагических, так и в некротических клетках. Напротив, уровни АТФ поддерживаются в нормальных и апоптотических клетках в соответствии с ограниченным количеством аутофагических вакуолей в их цитоплазме.

Флуоресцентная микроскопия и флуоресцентные методы детекции ПКГ. Этот метод часто используется для выявления апоптотических клеток. Исследуют как витально-окрашенные клетки во взвеси, так и фиксированные препараты. В случае необходимости фиксации и/или пермеабиллизации используют разные агенты:

1) Использование спиртов (этанола) – одновременно и фиксирующего, и пермеабиллизирующего агента. Использование спиртов обеспечивает легкий доступ красителя в ядро, а также хорошие характеристики анализируемого сигнала – низкий коэффициент вариации (CV). Однако, часто использование спиртов несовместимо с использованием флуоресцентных красителей. Фиксированные спиртом клетки стабильны в течение нескольких недель при температуре 4°C.

2) Использование альдегидов (параформальдегида) – фиксирующего агента. Использование альдегидов позволяет одновременную (синхронную) детекцию различных флуорохромов и мембран-связанных протеинов. Однако, использование альдегидов приводит к ухудшению характеристик анализируемых сигналов (высокий коэффициент вариации), а также в большинстве случаев альдегиды только фиксируют, но не пермеабиллизируют мембраны, что приводит к необходимости применять дополнительные пермеабиллизирующие агенты, такие как Triton X-100 (0.1%) и др. Фиксированные альдегидом клетки стабильны в течение двух-трех дней при температуре 4°C.

Для окрашивания ядра используют флуорохромы, специфически связывающиеся с ДНК: DAPI, Hoechst 33342, акридиновый оранжевый и бромистый этидий. Для анализа биохимических маркеров апоптоза используют специфические красители. Аннексин V (или Аннексин A5) принадлежит семейству аннексинов, внутриклеточных белков, связывающих фосфолипиды. Аннексин V обычно используется в проточной цитометрии и флуоресцентной микроскопии для определения апоптотических клеток,

благодаря его способности специфически связываться с фосфатидилсерин (ФС) кальций-зависимым образом. Метод был впервые описан Коорман с соавт. (1994).

Одним из ранних проявлений программируемой клеточной гибели (апоптоза) является нарушение асимметрии фосфолипидного бислоя. В здоровых клетках фосфатидилсерин содержится только с внутренней стороны плазматической мембраны. Во время апоптоза мембранная асимметрия исчезает, ФС перемещается на наружную сторону мембраны и становится доступным для связывания флуоресцентно меченным аннексином V (Рис. 11). Данная транслокация опосредована активацией скремблазы Xkr8, после ее расщепления эффекторной каспазой-3.

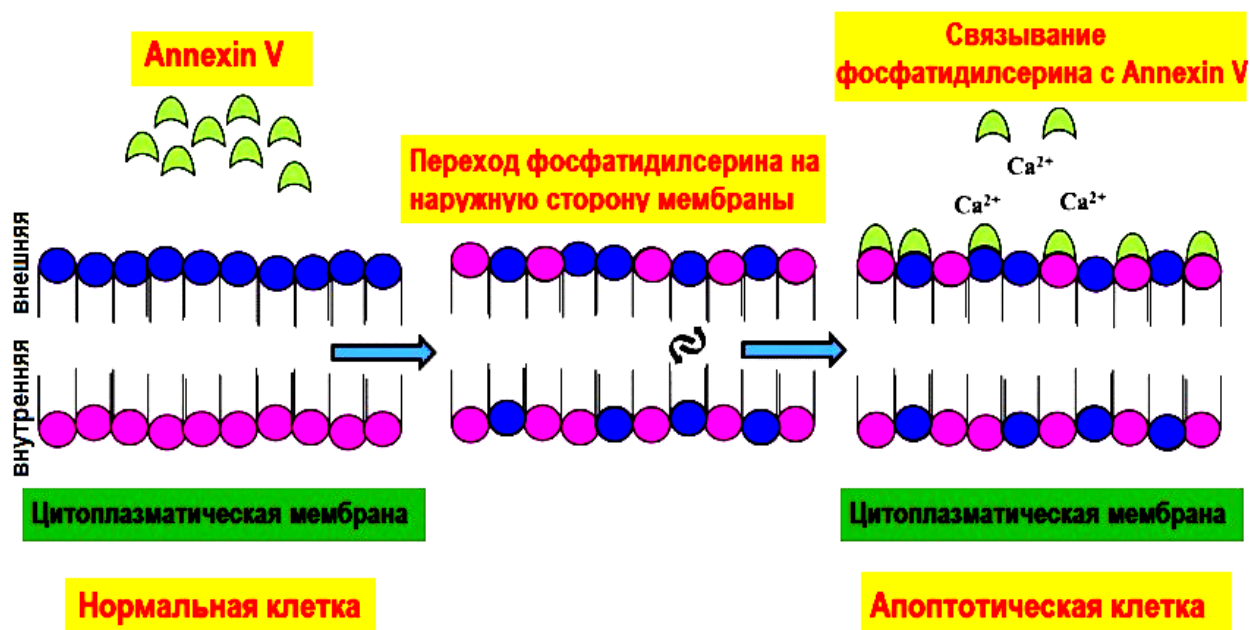


Рис. 11. Связывание фосфатидилсерина с Annexin V.

В сочетании с другими прижизненными красителями, такими как йодистый пропидий (PI), связывание аннексина V с ФС позволяет различать популяции здоровых (*Аннексин-PI-*), апоптотических (*Аннексин+PI-*, *Аннексин+PI+*) и некротических (*Аннексин-PI+*) клеток и проводить количественный анализ клеточной гибели в результате апоптоза и/или некроза.

Пропидий йодид (PI) легко проникает в мертвые клетки, клетки на последних стадиях апоптоза, фиксированные клетки или клетки с поврежденными плазматическими мембранами. Поэтому окрашивающий буфер с пропидий йодидом широко используется для отделения живых клеток от мертвых в экспериментах при проведении иммунофлуоресцентного окрашивания нефиксированных клеток (рис. 12).

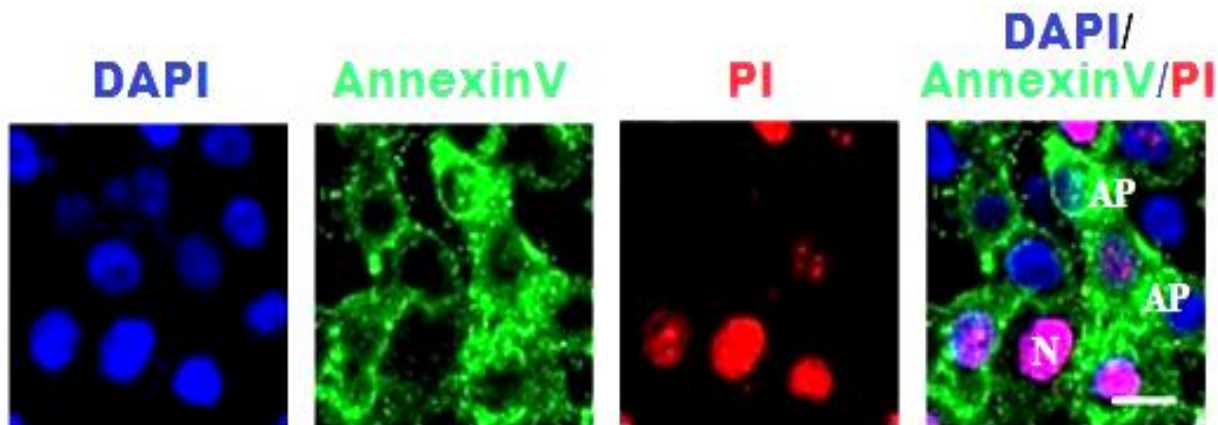


Рис. 12. Пример микрофотографий клеток, окрашенных тремя красителями – DAPI (ядро), AnnexinV (фосфатидилсерин) и PI (ядра клеток с поврежденными мембранами), полученные на флуоресцентном микроскопе. Подобная тактика окрашивания позволяет выявлять апоптотические (AP) и некротические (N) клетки.

Кроме того, для выявления цитоплазматических белков-маркеров апоптоза (например, каспаз), используют специфичные антитела к таким белкам, конъюгированные с различными флуорохромами.

Для детекции аутофагии в клетках применяют различные флуоресцентные красители, которые избирательно связываются с LC3B белком - специфическим маркером аутофагии, экспрессирующийся на активированной мембране аутофагосомы (Кабеуа, 2000), что позволяет визуализировать их с помощью флуоресцентной микроскопии и проточного цитофлуориметра. А дополнительное окрашивание лизосом, позволяет детектировать аутофаголизосомы – поздние проявления аутофагии (рис. 13).

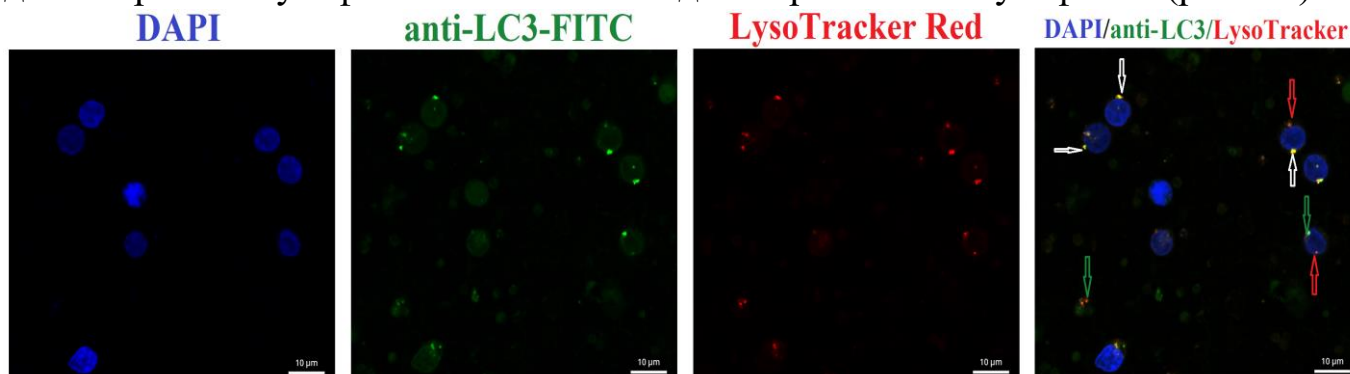


Рис. 13. Пример микрофотографий лимфоцитов, окрашенных DAPI (ядро) и антителами, специфичными к LC3 белку, конъюгированные с флуорохромом FITC (флуоресцирующий зеленым светом). Дополнительное окрашивание лизосом флуоресцентным красителем позволяет детектировать аутофаголизосомы. Белые стрелки – аутофаголизосомы, зеленые стрелки – аутофагосомы, красные стрелки – лизосомы.

Аналитические методы молекулярной биологии, применяемые для детекции программированной клеточной гибели

Метод проточной цитометрии. Для количественной оценки программированной клеточной гибели чаще всего используют проточную цитометрию – метод, который основан на регистрации флуоресценции и светорассеяния от отдельных клеток или частиц, проходящих через лазерный луч в струе жидкости. Большинство современных проточных цитометров могут измерять внешние клеточные свойства (экспрессию маркеров клеточной поверхности) или экспрессию внутриклеточных маркеров, содержание нуклеиновых кислот, активность ферментов и многое другое. Чтобы исследовать эти клеточные особенности, используются флуоресцентные реагенты, в том числе антитела, конъюгированные с флуорохромом. Эти реагенты имеют характерные свойства светоизлучения, так что они могут быть обнаружены отдельно в различных параметрах флуоресценции (рис. 14).

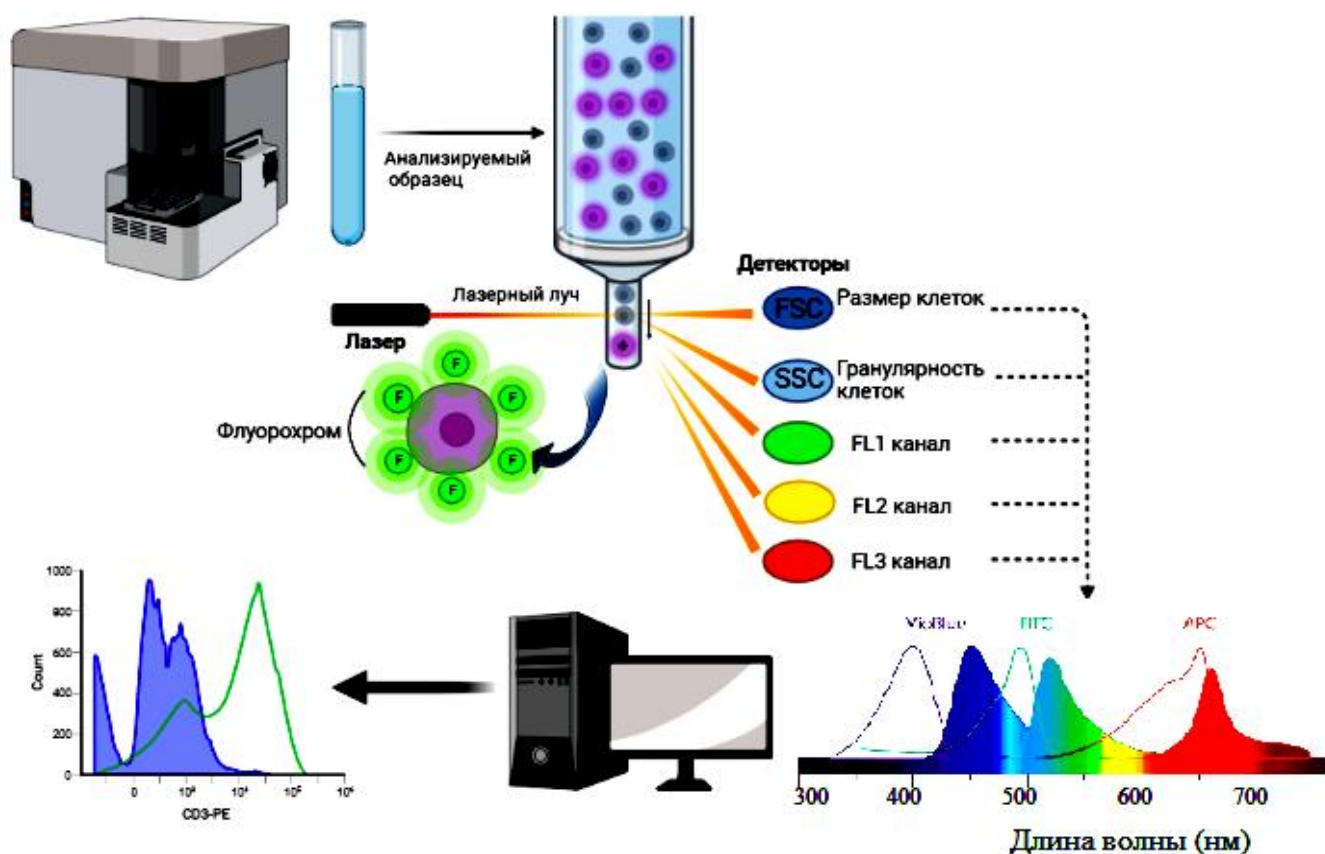


Рис. 14. Спектры возбуждения и испускания для флуорохромов VioBlue, FITC, and APC. Сплошные линии: спектр возбуждения. Площадь залитая цветом: спектр испускания. FITC = Максимум возбуждения (Ex):495 нм, максимум эмиссии (Em):519 нм. APC = Максимум возбуждения (Ex): 650 нм, максимум эмиссии (Em):660 нм. VioBlue = Максимум возбуждения (Ex):400 нм, максимум эмиссии (Em):452 нм.

Уникальным атрибутом проточной цитометрии является то, что флуоресценция на клеточном уровне или уровне частиц может быть измерена очень быстро. Когда флуоресцентно-меченные клетки или частицы проходят через луч света, флуоресцентные зонды возбуждаются. Обнаружение испускаемого света и, в конечном счете, определенных клеточных свойств происходит со скоростью 10000 событий / секунду.

Анализ апоптотической (программируемой) клеточной гибели AnnexinV-FITC/PI. Цитометрический анализ апоптотической (программируемой) клеточной гибели с помощью AnnexinV-FITC/PI – один из комплекса методов исследования апоптоза с помощью проточной цитометрии. AnnexinV-FITC/PI – самый распространенный и легко воспроизводимый тест для исследования апоптоза клетки, который, однако, не заменяет другие тесты, и для получения полноценных данных применяется в комплексе с ними. Метод основан на:

- регистрации изменений архитектуры наружной плазматической мембраны клетки на третьей стадии апоптоза. В нормальных живых клетках фосфолипид фосфатидилсерин находится во внутреннем слое мембраны клетки, в то время как в наружном слое мембраны он представлен в минимальных количествах. На третьей стадии апоптоза фосфатидилсерин экстернализуется из внутреннего слоя мембраны в наружный. В присутствии ионов Ca^{2+} AnnexinV специфично связывается с фосфатидилсероном, находящемся в наружном слое мембраны, и конъюгированный с флуоресцентной меткой (FITC) он позволяет определить начало 3 стадии апоптоза;

- неспособности PI входить в живые клетки, а также в клетки с нетронутой наружной плазматической мембраной. PI начинает входить в клетки только в конце третьей стадии апоптоза после того, как целостность наружной мембраны нарушается.

Таким образом, используя конъюгат AnnexinV-FITC в комбинации с ДНК красителем PI, можно разделить исследуемый образец на 4 популяции (рис. 15):

- популяция условно живых клеток: негативный сигнал от обоих красителей (FITC-/PI-);

- популяция клеток на ранней/ средней стадии апоптоза: позитивный сигнал FITC и негативный сигнал PI (FITC+/PI-);

- популяция клеток на поздней стадии апоптоза / условно некротические клетки: позитивный сигнал FITC и позитивный сигнал PI (FITC+/PI+);

- некротические клетки / остатки клеток: негативный сигнал FITC и позитивный сигнал PI (FITC-/PI+).

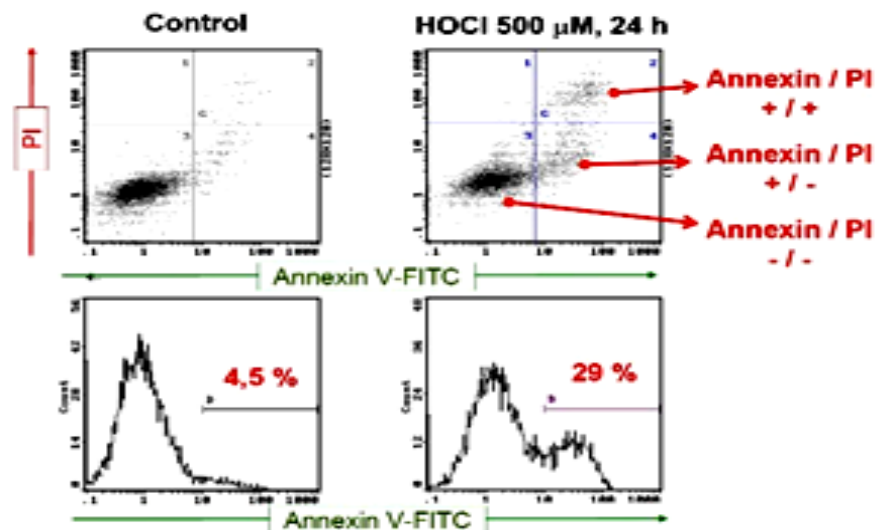


Рис. 15. Пример анализа клеток окрашенных конъюгатом Annexin V-FITC и пропидий йодидом, методом проточной цитометрии. Annexin V/PI -/- – живые клетки; Annexin V/PI +/- – апоптотические клетки на ранней стадии; Annexin V/PI +/+ – апоптотические клетки на поздней стадии. Annexin V/PI -/+ – некротические клетки.

Выявление олигонуклеосомной деградации ДНК методом проточной цитометрии. Одним из более поздних этапов апоптоза является фрагментация ДНК, процесс, который начинается с активации эндонуклеаз, активирующиеся во время программы апоптоза. Эти нуклеазы расщепляют структуру хроматина более высокого порядка на фрагменты размером от 50 до 300 т.п.н., а затем на более мелкие фрагменты ДНК длиной около 200 п.н. В методе, который часто используется для обнаружения фрагментированной ДНК, используется реакция, катализируемая экзогенной TdT (Terminal deoxynucleotidyl Transferase, концевая дезоксирибонуклеотидилтрансфераза), называемая «мечением концов» или окрашиванием TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl Transferase — mediated dUTP — biotin Nick— End Labeling, или терминальное дезоксиуридиновое мечение концов).

Фермент терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы (TdT) катализирует независимое от матрицы присоединение бромированных дезоксирибонуклеотид трифосфатов (Br-dUTP) к 3'-гидроксильным (ОН) концам двух- и одноцепочечной ДНК. Было показано, что Br-dUTP легче встраивается в геном апоптотических клеток, чем дезоксирибонуклеотидтрифосфаты, образующие комплексы с более крупными молекулами, такими как флуоресцеин, биотин или дигоксигенин. После включения эти сайты идентифицируют с помощью проточной цитометрии путем окрашивания клеток FITC-мечеными моноклональными антителами против BrdU (рис. 16).

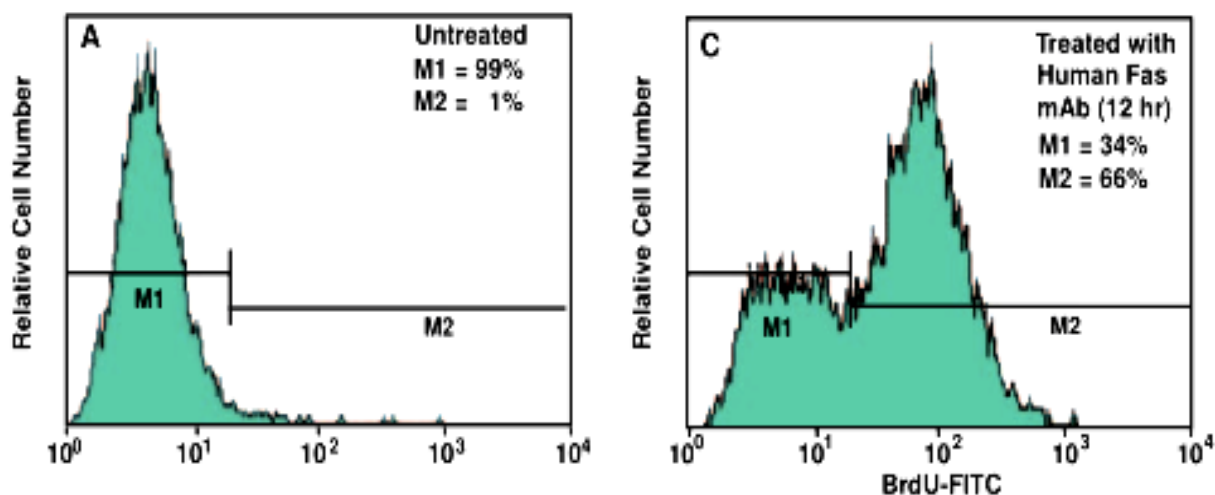


Рис. 16. Клетки необработанные (А) и обработанные моноклональными антителами против Fas человека, в течение 12 часов (С). Клетки фиксировали и инкубировали с Br-dUTP в присутствии фермента TdT, чтобы включить Br-dUTP в открытые 3'-ОН концы ДНК. Br-dUTP выявляли с помощью меченных флуоресцеином mAb против BrdU. Неапоптотические клетки (ворота M1) не включают значительные количества Br-dUTP из-за отсутствия открытых 3'-ОН-концов ДНК и, следовательно, имеют относительно слабую флуоресценцию по сравнению с апоптотическими клетками, которые имеют обилие 3'-ОН-концов (ворота M2).

Изучение функционального состояния клеток. К ним относятся, например, оценка митохондриального потенциала, оценка редокс-потенциала клеток и т.д.

Снижение потенциала митохондриальной мембраны и повышение проницаемости мембраны могут вызвать высвобождение эндогенных митохондриальных апоптотических факторов, включая CytC, AIF, SMAC/DIABLO, HTRA2/OMI и ENDOG (рис. 17). Cyt C взаимодействует с Araf-1 после высвобождения в клетки, образуя комплекс для апоптоза с помощью АТФ и dATP. Затем этот комплекс соединяется с Pro-Caspase 9, а также активирует его с образованием Caspase 9. Caspase 9 может вызвать дальнейшую активацию как Caspase 3, так и Caspase 7, чтобы начать каскадную реакцию каспаз и разрезать более 100 видов субстрата в клетках, таких как α -тубулин, актины, PARPA, ламин и т. д.

С изменением потенциала митохондриальной мембраны AIF и ENDOG также могут высвободиться в цитоплазму, а затем переноситься в ядро клетки, чтобы вызвать конденсацию хромосом и фрагментацию ДНК, вызывая апоптоз.

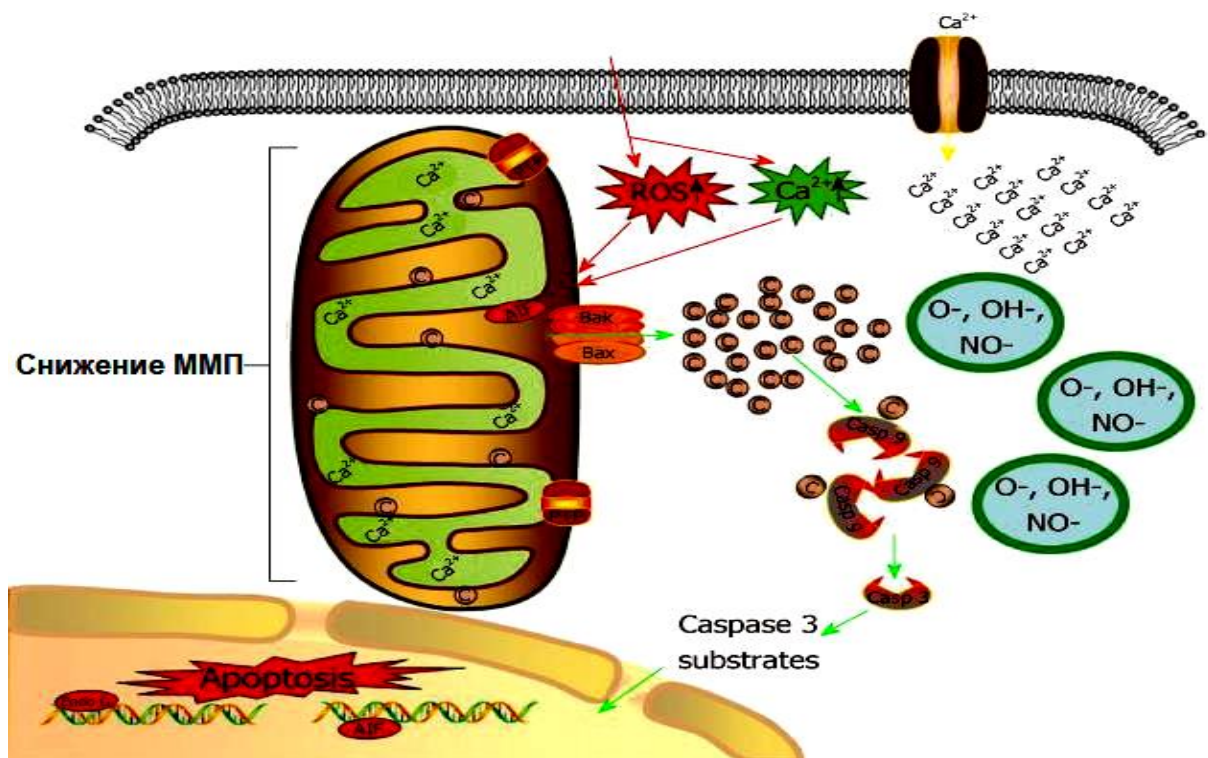


Рис. 17. Снижение потенциала митохондриальной мембраны и высвобождение цитохрома С из митохондрий. Цитохром С способствует апоптозу клеток путем активации каскада каспаз. ROS - активные формы кислорода; C - цитохром С; Casp - каспаза; AIF - фактор, индуцирующий апоптоз; ММП - потенциал митохондриальной мембраны.

На практике, для определения апоптоза в клетках со сниженным митохондриальным потенциалом используют различные красители. Например, JC-1 представляет собой катионный карбоцианиновый краситель, который накапливается в митохондриях живых клеток потенциал-зависимым образом. В низких концентрациях и на деполяризованных мембранах краситель существует в виде зеленого флуоресцентного мономера. При более высоких концентрациях (водные растворы выше 0,1 мкМ) и на гиперполяризованных мембранах краситель образует J-агрегаты, которые имеют эмиссию в оранжевом канале. J-агрегаты возбуждаются при 535 нм, а мономерная форма и агрегаты вместе — при 475 нм.

Здоровые клетки имеют высокий митохондриальный мембранный потенциал, а снижение митохондриального мембранного потенциала является маркером ранней стадии апоптоза. Это позволяет использовать изменения соотношения оранжевой/зеленой флуоресценции JC-1 для различения здоровых и деполяризованных митохондрий. Соотношение красной/зеленой флуоресценции JC-1 зависит только от потенциала митохондриальной мембраны, но не от других факторов, таких как размер, форма и плотность митохондрий.

Методы анализа программированной клеточной гибели на основе гель-электрофореза. Анализ ДНК-лестницы, образующаяся при фрагментации ДНК во время апоптоза, происходит в две стадии. На первом этапе фрагментации образуются высокомолекулярные фрагменты ДНК размером 50–300 тысяч пар оснований (т.п.о.). На втором этапе образуются относительно меньшие по размеру фрагменты, содержащие 180–200 п.о. Эта стадия фрагментации происходит на межнуклеосомном уровне и приводит к появлению моно- и олигонуклеосом. Экстракцию ДНК проводят хлороформом-изоамиловым спиртом и изопропанолом, а затем олигонуклеосомы отделяют от экстрагированной ДНК на 1,5% агарозном геле и визуализируют после окрашивания бромистым этидием (рис. 18). Нуклеосомную лестницу обычно называют «ДНК-лестницей». Некроз развивается при быстром неспецифическом расщеплении ДНК, а апоптоз активирует эндонуклеазы, которые расщепляют ДНК на фрагменты размером около 180–200 п.о. Вот почему выделенная ДНК из некротических клеток выглядит как срез, а из апоптотической клетки дает лестничный узор. Хорошо известно, что при электрофорезе в агарозном геле, если образец содержит очень мало апоптотических клеток, не проявляется лестница ДНК. Более того, анализ ДНК-лестницы обычно считается методом, специфичным для апоптоза, поскольку он обнаруживает расщепление олигонуклеосом, а не искусственное расщепление или некроз ДНК. Этот метод используется для разделения низкомолекулярных фрагментов ДНК, образующих лестницу. Такой паттерн деградации ДНК служит маркером гибели клеток в результате апоптоза и является специфическим для апоптоза методом обнаружения гибели клеток.

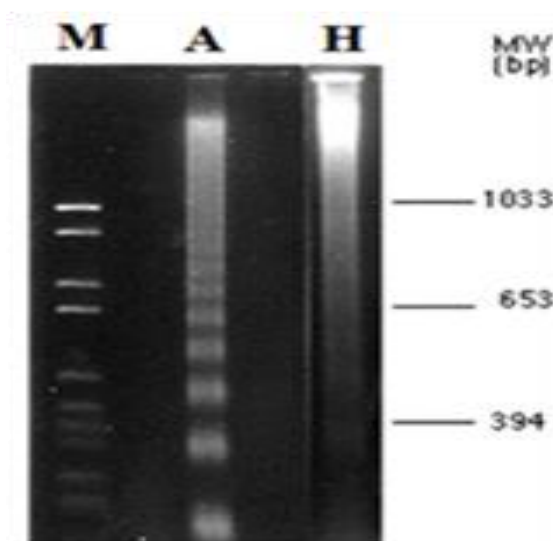


Рис. 18. Электрофореграмма ДНК клеточной линии Jurkat в 1% агарозном геле. М – маркер ДНК 1 kb DNA ladder; А – апоптотическая ДНК фрагментация с образованием характерной лестницы; Н – некротический «хвост» ДНК

Вестерн-блот анализ белков, ассоциированных с программированной клеточной гибелью. Наиболее часто используемым методом иммунологического анализа в настоящее время является вестерн-блот. Вестерн-блоттинг (иммуноблоттинг, от англ. *Blotting* — промокание) — современный высокочувствительный аналитический метод, используемый для определения в образце специфичных белков с помощью антител. В оптимально подобранных условиях вестерн-блоттингом можно обнаружить белок в количестве менее 1 нг.

Этапы вестерн-блоттинга (рис. 19):

- Разделение белков методом SDS-электрофореза. Наиболее распространенным способом разделения белков является электрофорез в полиакриламидном геле, в присутствии додецилсульфата натрия (англ. SDS). В присутствии SDS белки, подлежащие анализу, приобретают одинаковый отрицательный заряд, что делает возможным их разделение в зависимости только от молекулярной массы. Денатурированные белки мигрируют в электрическом поле через акриламидный гель к аноду, при этом белки меньшего размера двигаются быстрее.

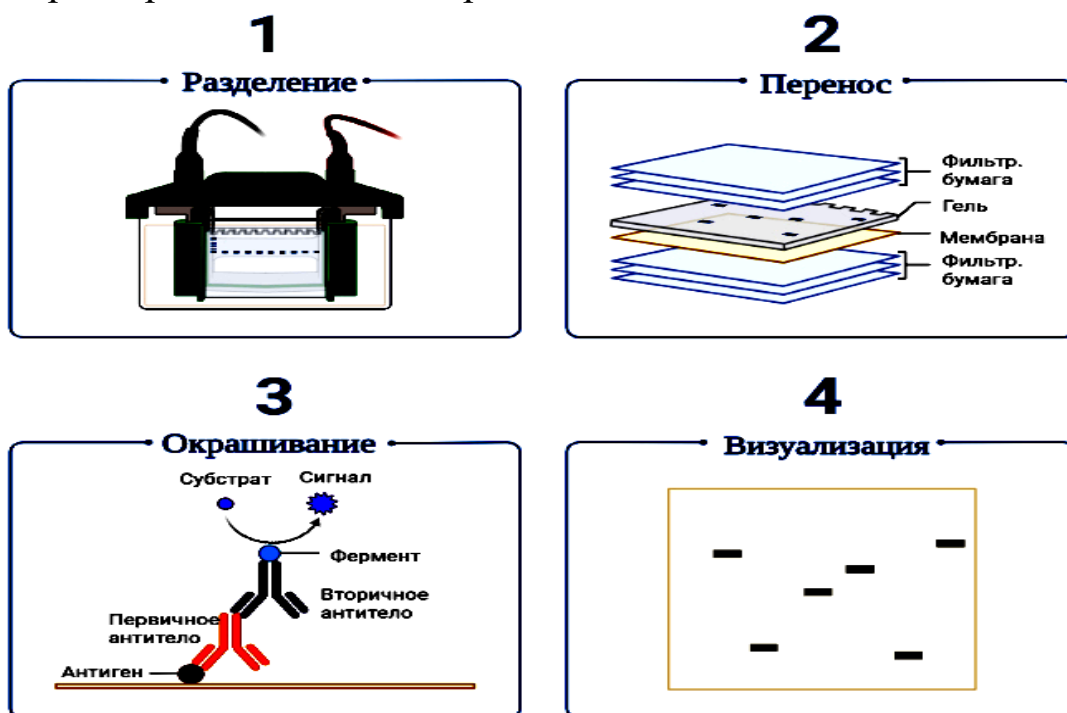


Рис. 19. Схема постановки вестерн-блоттинга. Основными этапами постановки вестерн блотта являются разделение белков методом гель-электрофореза в полиакриламидном геле, перенос разделенных белков из геля на мембрану, связывание исследуемого белка с антителами и визуализации исследуемого белка путем проведения соответствующей биохимической реакции с образованием продукта, который определяют колориметрическим, хемилюминесцентным или флюоресцентным методами детекции.

Так же на гель наносят маркеры (смесь белков с известными молекулярными массами). Отличия в скорости продвижения (электрофоретической подвижности) приводит к разделению белков на полосы.

- Перенос белков из геля на мембрану (изготовленную из нитроцеллюлозы или поливинилиденфторида (англ. PVDF) происходит под действием электрического тока. В результате этого процесса белки оказываются в тонком поверхностном слое мембраны, где за счет гидрофобных и электростатических взаимодействий происходит их связывание с мембраной. Белки перемещаются из геля на мембрану с сохранением своего расположения. Таким образом, после электропереноса мы получаем на нитроцеллюлозе реплику геля с белками, расположенными так же, как и в полиакриламидном геле.

- Блокирование. Для того, чтобы предотвратить неспецифическое связывание антител с мембраной, последнюю инкубируют в разбавленном растворе белка — обычно используют бычий сывороточный альбумин или обезжиренное сухое молоко. Белок из разбавленного раствора связывается с мембраной в тех местах, где нет белковых полос. В результате антитела при их добавлении могут связываться только со специфичными сайтами связывания исследуемых белков. Блокирование позволяет достичь чистого фона и исключить получение ложноположительных результатов.

- Связывание исследуемого белка с антителами. После блокирования мембраны ее отмывают буфером (3 раза) и последовательно инкубируют с различными антителами методом «сэндвича»: сначала белки связываются с первичными (моно- или поликлональными) антителами, которые, в свою очередь, связываются со вторичными антителами, конъюгированными с ферментами (пероксидазой хрена или щелочной фосфатазой).

- Детекция. Визуализации исследуемого белка достигают путем проведения соответствующей биохимической реакции с образованием продукта, который определяют колориметрическим, хемилюминесцентным или флюоресцентным методами детекции. Количество белка оценивают с помощью денситометрии.

С помощью этого метода определяют наличие белков, составляющих каскад биохимических процессов, приводящих к апоптотической, либо аутофагической гибели. На основании полученных данных делают выводы о возможности вступления тех или иных клеточных элементов в апоптоз.

Методом вестерн-блоттинга может быть оценена экспрессия ключевых медиаторов апоптотической гибели – каспаз, представляющие собой семейство цистеиновых протеаз. Форма-предшественник всех каспаз состоит

из продомена, большой и малой каталитических субъединиц. Всем известным каспазам требуется расщепление рядом с аспаратом для высвобождения одной большой и одной малой субъединиц, которые объединяются в тетрамер a_2b_2 с образованием активного фермента.

Ген каспазы-3, также известный как *Yama*, *CPP32* и апопаин, кодирует белок массой 32 кДа. Каспаза-3 активируется в результате расщепления в Asp-28/Ser-29 (между N-концевым про-доменом) и Asp-175/Ser-176 (между большой и малой субъединицами) с образованием большой (17 кДа) и малой (12 кДа) субъединиц, что можно обнаружить вестерн-блоттом (рис. 20).

Еще один важный медиатор апоптотической гибели - Fas/APO-1/CD95 (36 кДа) - является членом надсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNF), семейства трансмембранных рецепторов. Связывание лиганда Fas (Fas-L) индуцирует тримеризацию Fas в мембране клетки-мишени. Активация Fas вызывает рекрутирование Fas-ассоциированного белка с доменом смерти (FADD) посредством взаимодействия между доменами смерти Fas и FADD. Прокаспаза 8 связывается с Fas-связанным FADD посредством взаимодействия между эффекторными доменами смерти (DED) FADD и прокаспазой 8, что приводит к активации каспазы 8. Активированная каспаза 8 расщепляет (активирует) другие прокаспазы, фактически запуская каспазный каскад, который в конечном итоге приводит к апоптозу. Каспазы расщепляют ядерные ламины, в результате чего ядро разрушается и теряет свою нормальную структуру.

Bcl-2 - представляет собой апоптотический белок и член семейства Bcl-2. Существуют две зарегистрированные изоформы $\alpha = 25$ кДа; $\beta = 22$ кДа (рис. 20). Белок Bcl-2 образует гомо- или гетеродимеры с другими членами семейства Bcl-2. Bcl-2 распределяется во внешней митохондриальной мембране, ядерной оболочке и эндоплазматическом ретикулуме. Этот белок блокирует апоптотическую гибель, контролируя проницаемость митохондриальной мембраны. Установлено, что Bcl-2 регулирует ход клеточного цикла посредством активных форм кислорода. Этот белок модифицируется за счет фосфорилирования ASK1/JNK1, PKC, ERK и стресс-активируемой киназы и может подвергаться убиквитинированию. Показано, что Bcl-2 взаимодействует с Araf-1, Raf-1, TP53BP2, каспазой-3 и образует гетеродимеры с Bax, Bad, Bak, Bcl-xL и Bag-1.

Метод вестерн-блоттинга также может быть использован и для оценки экспрессии белков, ассоциированных с аутофагической гибелью. Как уже было сказано выше, LC3 белок является маркером аутофагии, а точнее II изоформа этого белка. LC3 белок присутствует в цитозоле большинства типов клеток и существует в трех изоформах (A, B и C). При запуске аутофагии под

воздействием цистеиновой протеазы Atg4 он протеолитически разрушается, образуя LC3-I форму. Отщепленный LC3-I белок затем активируется с помощью E1-подобного фермента Atg7 и переносится к Atg3 белку до его конъюгации с фосфатидилэтаноламином и образования LC3-II формы. LC3-II белок вовлекается в растущую фагофору и располагается на внутренней и внешней мембране аутофагосомы. Преобразование LC3-I (18 кДа) в LC3-II (14 кДа) значительно повышается при культивировании клеток в условиях голодания (без аминокислот и сыворотки), эффективно вызывая аутофагию. Поэтому, количество LC3-II хорошо коррелирует с числом аутофагосом. Эта характеристика преобразования LC3 используется для мониторинга аутофагии (рис. 20).

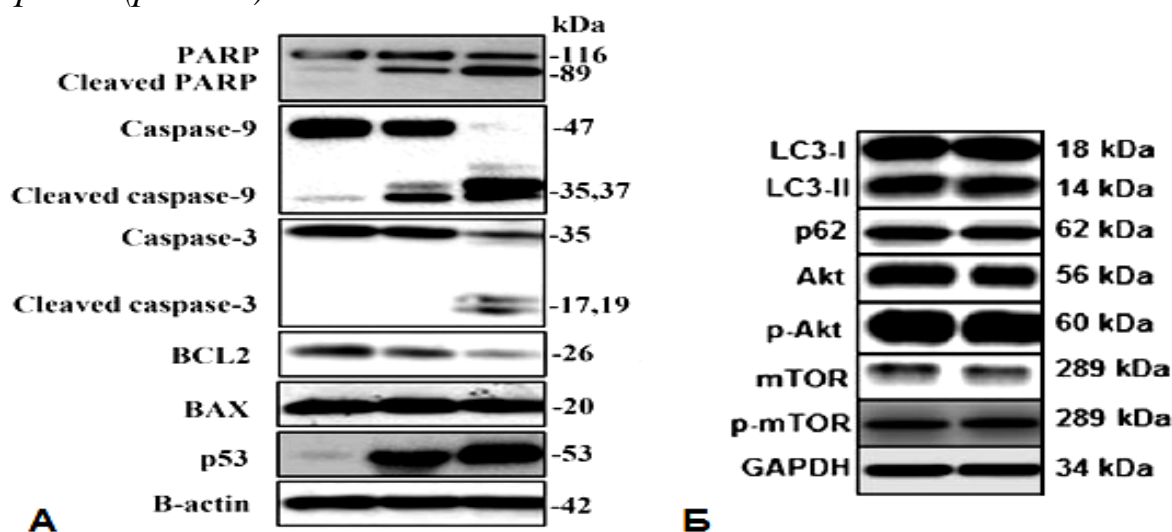


Рис. 20. Репрезентативный пример вестерн-блот анализа белков, ассоциированных с апоптозом (А) и аутофагией (Б).

Заключение

К настоящему времени разработаны различные методы обнаружения различных форм гибели клеток, позволяющие идентифицировать и отличать поврежденные клетки от здоровых клеток, а также наблюдать за эффектом терапевтического агента. В приведенном разделе были кратко рассмотрены механизмы и способы обнаружения различных традиционных и нетрадиционных методов гибели клеток.

Морфологические проявления клеточной гибели включают сморщивание клеток, вздутие мембраны, повышение плотности цитоплазмы, пикноз, которые можно наблюдать при световой микроскопии при обычном методе окрашивания. Окрашивание гематоксилином показывает различные специфические для типа клеток виды конденсации гетерохроматина, которые очень важны с диагностической точки зрения, в то время как эозин окрашивает ядрышки. Цитоплазма апоптотической клетки имеет отчетливый оттенок синего, если присутствуют многочисленные полирибосомы. Зону

Гольджи обычно можно идентифицировать по отсутствию окрашивания в области вблизи ядра. Световая микроскопия — недорогой метод обнаружения апоптоза, однако он подвержен ошибкам и требует опыта. Воспроизводимость и объективность этого метода также очень низки, потому что он обнаруживает небольшое количество апоптотических клеток. По сравнению со световой микроскопией электронная микроскопия лучше выявляет субклеточные изменения. В нем обнаруживаются наиболее явные изменения, такие как обширное вздутие плазматической мембраны, конденсация хроматина и его периферическая агрегация под ядерной мембраной, разделение фрагментов клеток на апоптотические тельца. Электронная микроскопия позволяет наблюдать тонкие ультраструктурные изменения, связанные с гибелью клеток, такие как разрывы в плазме и/или внешней мембране митохондрий, набухание митохондрий и первые стадии конденсации хроматина (которые лишь позже становятся видимыми при световой микроскопии). Хотя электронная микроскопия может предоставить много ультраструктурной информации, визуальный осмотр электронных микрофотографий всегда должен сопровождаться строгим количественным подходом. Действительно, поскольку анализ выполняется для каждой клетки и может быть изучено только подмножество клеток в каждом образце, для исследователей крайне важно избегать сосредоточения внимания на редких (или даже фиктивных) морфологиях. Кроме того, подготовка/окрашивание образцов для электронной микроскопии занимает много времени и требует привлечения обученного персонала. Тем не менее, методы иммуноэлектронной микроскопии могут дать очень полезную информацию. Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) и просвечивающая электронная микроскопия (ТЭМ) — это два метода, которые можно использовать для изучения морфологических изменений, связанных с гибелью клеток. ТЭМ считается «золотым стандартом» в области исследования гибели клеток и обладает более высокой разрешающей способностью (0,1–0,4 нм). Фактически, он выдает двух- и трехмерное изображение внутренней клетки и позволяет понять биологические отношения структуры и функции на субклеточном и молекулярном уровнях. По этим причинам ТЭМ считается наиболее точным методом различения апоптоза и некроза в клеточных культурах, однако это трудоемкий и дорогой метод анализа программированной клеточной гибели.

Что касается микроскопических методов, анализ связывания аннексина V можно визуализировать с помощью проточной цитометрии, световой и флуоресцентной микроскопии. По сравнению с другими красителями (PI, 7-AAD и трипановым синим, которые являются непроницаемыми

красителями), аннексин V обнаруживает апоптоз, когда еще клеточная мембрана частично интактна и другие красители не могут детектировать начало апоптоза. Однако аннексин V специфичен для фосфатидилсерина и показывает минимальное связывание с другими фосфолипидами, такими как фосфатидилхолин и сфингомиелин, которые конститутивно присутствуют во внешней плазматической мембране. Еще одним недостатком Аннексина V является возможность появления ложноположительного результата за счет его проникновения в некротические клетки и связывания с ФС, что делает его менее надежным и делает обязательным использование дополнительной окраски.

Одним общепризнанным и очень важным биохимическим признаком запрограммированной гибели клеток является фрагментация ДНК, которая приводит к характерной «лестнице ДНК», однако ее отсутствие не исключает того факта, что клетки подвергаются клеточной гибели, поскольку фрагментация ДНК является более поздним событием апоптоза. процесс. Анализ ДНК-лестницы подходит для тканей или клеточных культур с большим количеством апоптотических клеток на массу ткани, но не идеален для клеток с низким числом. По сравнению с анализом лестницы ДНК метод TUNEL идентифицирует апоптотические клетки и меченые клетки до того, как фрагментация ДНК перейдет в точную ядерную фрагментацию. TUNEL метод является наиболее популярным и более чувствительным методом. Реакции анализа TUNEL основаны на прямом мечении 3'-ОН-концов разрывов ДНК, и эти разрывы обнаруживаются на молекулярном уровне. Анализ TUNEL можно использовать для обнаружения начала апоптоза, поскольку он выявляет разрывы ДНК, происходящие на ранней стадии апоптоза, когда апоптоз не может быть обнаружен морфологически. Напротив, TUNEL является дорогостоящим анализом из-за высокой стоимости ферментов и антител, которые используются в анализе. Кроме того, гистологическая фиксация и предварительная обработка также влияют на обнаружение разрывов нити ДНК. Серьезным недостатком является обнаружение некротических клеток, дающее ложноположительные результаты апоптоза. Кроме того, иногда TUNEL метод идентифицирует клетки в процессе репликации ДНК и активной транскрипции генов и дает ложноположительные результаты.

ДНК-специфические флуорохромы также выявляют апоптоз, когда плазматическая мембрана интактна. Красители, такие как пропидий йодид (PI), DAPI, трипановый синий, Hoechst и акридиновый оранжевый, используются для обнаружения апоптоза. PI не проникает в клетку на ранней стадии апоптоза из-за интактной клеточной мембраны, однако окрашенные

Hoechst 33342 апоптотические клетки выглядят ярче, чем контрольные. Обнаружение апоптоза с помощью ДНК-специфических флуорохромов является простым, быстрым, точным и количественным методом как в жизнеспособных, так и в фиксированных одиночных клетках, но это многоэтапный процесс, а для интактных тканей требуется предварительная обработка ферментом для высвобождения отдельных клеток для анализа. Поэтому для получения достоверных результатов недостаточно применения одного из вышеперечисленных методов. При изучении программированной клеточной гибели необходим комплексный подход с использованием как морфологических, так и молекулярных методов анализа.

Таким образом, современные представления о различных механизмах гибели в организме в ходе физиологического и патологического развития значительно обогатились за последние два десятилетия. В последние годы изучение клеточной гибели становится одной из наиболее бурно развивающихся областей науки. Понимание механизмов клеточной гибели открывает перед нами возможность не только понять причины возникновения многих заболеваний, но и научиться регулировать их. В связи с этим представляется чрезвычайно важным внесение знаний о программированной клеточной гибели в систематические курсы иммунологии, биохимии, цитологии, гистологии, эмбриологии и патологии, преподаваемые в высших учебных заведениях.

Литература по теме:

1. *Белушкина И.И.* Молекулярные основы патологии апоптоза / Белушкина И.И., Северин С.Е // Арх. пат. 2001. Т. 63.
2. *Бережков Н.В.* Апоптоз — управляемая смерть клетки // Арх. анат., гистол. и эмбриол.-1990.-Т. 99.
3. *Дудич Е.И.* Изучение апоптоза раковых клеток, индуцированного α -фетопротеином / Дудич Е.И., Семенкова Л.Н., Дудич И.В. и др.//Бюлл. эксперим. биол. и мед.-2000.-Т.130.
4. *Манских В.Н.* Морфологические методы верификации и количественной оценки апоптоза//Бюллетень сибирской медицины.- 2004.-Т.1.
5. Хавинсон В.Х., Кветной И.М. Пептидные биорегуляторы ингибируют апоптоз // Бюлл. эксперим.биол. и мед.-2000.-Т.130.
6. *Фридлянская И.И.* Индукция апоптоза в клетках мышинной миеломы NS0/1, трансформированной геном основного белка теплового шока/ Фридлянская И.И., Демидов О.Н., Булатова М.М // Цитология.-2000.-Т. 42.
7. Negoescu A., Guillermet C., Lorimier P. Importance of DNA fragmentation in apoptosis with regard to TUNEL specificity//Biomed-Pharmacother.-1998.- V.52.

Часть3. Протоколы методов изучения программированной клеточной гибели

Клеточные культуры

Клеточные культуры являются одним из основных инструментов, используемых в клеточной и молекулярной биологии, обеспечивая превосходную модельную систему для изучения нормальной физиологии и биохимии клетки (например, метаболические исследования, старение), воздействие наркотиков и токсических веществ на клетки, мутагенез и канцерогенез. Клеточная культура также используется в скрининге и разработке лекарственных средств, и производстве биологических соединений в больших масштабах (например, вакцин, терапевтических белков). Основное преимущество использования клеточных культур для любого из этих приложений является согласованность и воспроизводимость результатов, которые могут быть получены при использовании клеток.

Инструкция по работе с культурами клеток

- Для работы в лаборатории культуры клеток нужны отдельный лабораторный халат, перчатки и ботинки.

- Тягу в ламинарном боксе необходимо включить по крайней мере за 15 мин, прежде чем начать работать в нем.

- Время использования УФ-лампы составляет 15-30 мин.

- Тщательно протрите бокс 70% этанолом.

- Протрите все, что вы положили в ламинарный бокс 70% этанолом, а также, если Вы использовали водяную баню для согрева жидкостей.

- Протрите руки этанолом, даже если вы носите перчатки. Если вы оставили лабораторию культуры клеток и вернулись, вы должны надеть новые перчатки.

- Если вы капните какой-либо жидкостью (например, среда или PBS) внутри ламинарного бокса или CO₂ -инкубатора, очистить его немедленно тампоном с этанолом. *! Обратите внимание, если у вас капнет кровь, очистить ее сначала водой, а затем этанолом.*

- Все возможные инфекционные твердые отходы, например, кровь должны быть выброшены в отходы контейнера ГМО II, все твердые отходы культуры клеток в контейнер для отходов ГМО I. Все жидкие отходы в 5 л канистры.

!Обратите внимание, что вы не должны заполнять контейнеры для отходов слишком сильно, закройте его должным образом и принесите новую коробку с полиэтиленовым пакетом. Если пробирки, бутылки и т.д. не содержат клеточных материалов, выбросьте их в обычные отходы.

- После окончания работы очистите поверхность 70% этанолом. Уберите все лишние вещи из ламинара. Ламинарный бокс не место хранения!

- Если вы заметили контаминацию в бутылках для культуры клеток, сообщите всем, кто использует их.

- Обратите особое внимание на требование для стерильных пипеток: Не пипетируйте непосредственно в стерильный бутылке со средой, а отберите аликвоту, например, в 50 мл пробирку.

Расположение предметов в ламинарном боксе

Расположение элементов в ламинарном боксе (рис. 21) для культуры клеток обычно придерживается следующих правил, которые могут быть изменены, чтобы включить дополнительные элементы, используемые в конкретных приложениях:

- Широкое, чистое свободное пространство с рабочими принадлежностями для культуры клеток в центре. Дозатор располагается спереди в правой части, где его можно легко достать.

- Реагенты и среды в задней части справа, что позволяет легко перемешивать.

- Подставка для пробирок для дополнительных реагентов располагается посередине сзади.

- Контейнер для жидких отходов слева позади.

-

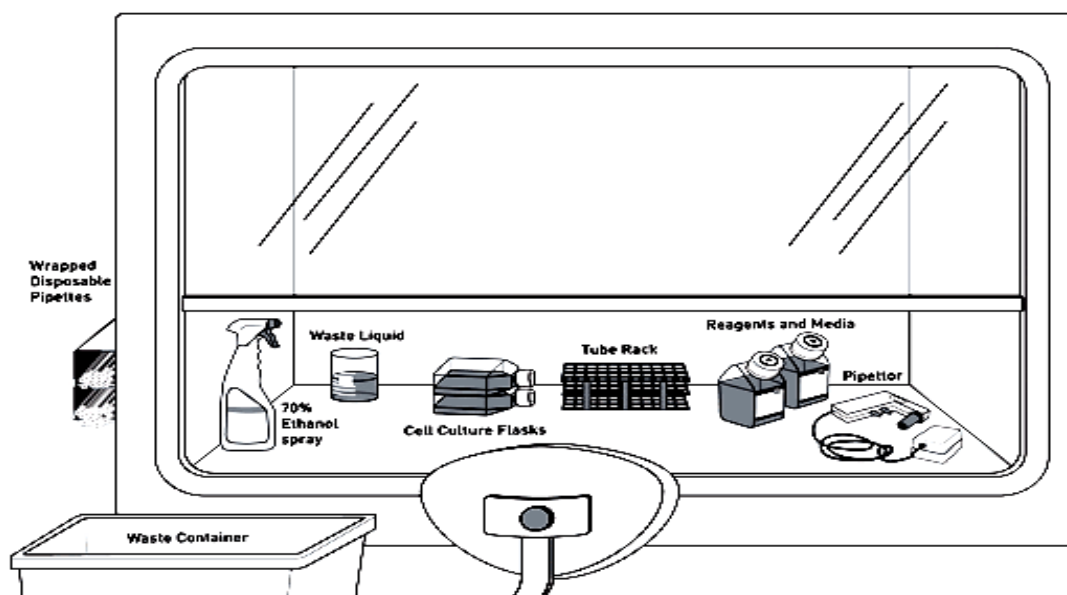


Рис. 21. Основная структура расположения предметов в ламинарном боксе культуры клеток для работников правойшей. Работники левши могут поменять местами предметы, разложенные на рабочей поверхности.

Выделение клеточных популяций на градиенте плотности фиколл-урографин

Принцип разделения клеток крови в градиенте плотности основан на различиях в величине их плавучей плотности.

При центрифугировании в градиентном растворе клетки крови перемещаются в пробирке до тех пор, пока не достигнут области градиента, где их плавучая плотность равна плотности среды.

Плотность градиента для фракционирования форменных элементов крови человека и животных различна. Для разделения лимфоидных клеток человека используют градиент плотности, равный $1,077 \text{ г/см}^3$, а лимфоцитов мыши – $1,119 \text{ г/см}^3$. При этом плавучая плотность лимфоцитов меньше, чем таковая величина используемого градиента, поэтому данные клетки располагаются над градиентом. Гранулоциты и эритроциты, имеющие большую плавучую плотность, в процессе седиментации проходят через градиентный раствор и опускаются на дно пробирки.

В качестве градиента плотности для разделения клеток крови можно использовать коммерческий препарат фиколл-400 (“Sigma-Aldrich” Швеция) или смесь фиколла с рентгено-контрастными веществами с высокой плотностью (урографин, верографин, уротраст или изопак).

Фиколл 400 - это гидрофильный полимер сахарозы с высоким молекулярным весом. Получают растворы, содержащие до 50% (вес/объем) фиколла, которые охватывают диапазон плотностей до 1,2 г/мл. Мол. вес фиколла 400 составляет 400000. Осмотическое давление его растворов ниже, чем растворов сахарозы эквивалентной концентрации (рис. 22), что позволяет использовать изотонические градиенты плотности и сохранять физиологические и морфологические свойства клеток и органелл в процессе центрифугирования. Фиколл 400 широко применяется в каждодневной работе с разделением клеток крови и для разделения клеток и органелл путем осаждения под действием силы тяжести. Для приготовления раствора фиколла его растворяют в теплой дистиллированной воде.

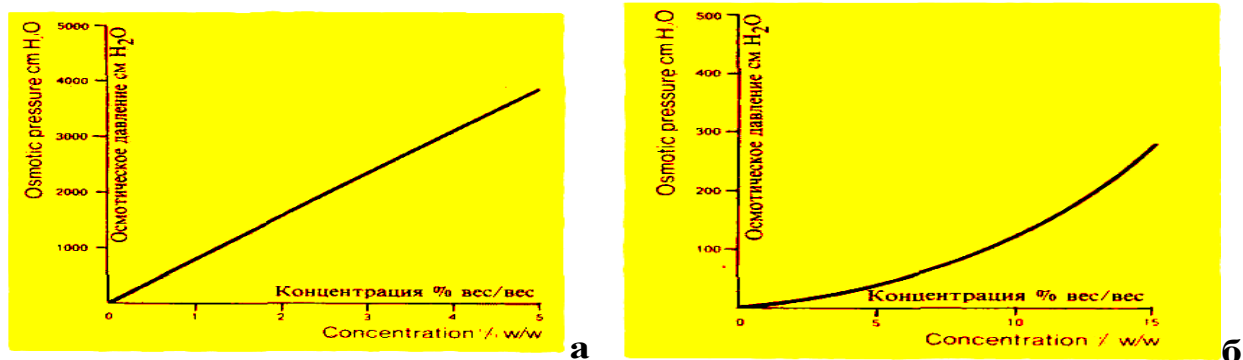


Рис. 22. Осмотическое давление: а - сахарозы, б - фиколла при 25°C.

Необходимые реагенты, материалы и оборудование:

• Реагенты: раствор фиколл-урографина с удельной плотностью $\rho = 1,077$ г/мл; фосфатно-солевой буфер (ФСБ);

• Материалы и оборудование: стерильные пластиковые или стеклянные пробирки емкостью 5–10 мл; центрифуга типа Eppendorf 5804; центрифужные пробирки; камера Горяева.

Буферные растворы:

1. Фосфатно-солевой буфер (ФСБ, pH 7,2-7,6): 8,09 мМ Na_2HPO_4 , 1,47 мМ KH_2PO_4 , 2,68 мМ KCl , 136,72 мМ NaCl .

Приготовление градиента плотности фиколл-урографина:

1. Подготовка фиколла: 4,32 г порошка фиколл-400 растворить в 48 мл дистиллированной воды.

2. Подготовка раствора рентгеноконтрастного вещества (в частности, урографина): 10,14 мл 76% раствора урографина довести дистиллированной водой до 21 мл.

3. Подготовка градиента плотности: растворы фиколл-400 и урографина смешать. С помощью ареометра измерить плотность полученного раствора, которая должна составлять 1,077 г/см. Если плотность выше, то добавить раствор фиколл-400, если ниже - раствор урографина.

Градиент плотности можно хранить в течение 30 суток при $+4^\circ\text{C}$ в стеклянной банке из оранжевого стекла. При отсутствии фиколл-400 градиент плотности можно приготовить только из одного рентгено-контрастного вещества. С этой целью 10 мл 76% раствора урографина смешать с 43,1 мл дистиллированной воды и добавить 0,45 мл ФСБ. Полученный при этом 14,3% раствор урографина имеет плотность 1,077 г/см и может быть использован в качестве градиента плотности.

Следует отметить, что при применении метода седиментации в градиенте плотности для выделения лимфоцитов из общей суспензии форменных элементов крови необходимо использовать кровь доноров или животных, освобожденную от фибрина.

Протокол:

Выделение лимфоцитов из крови (рис.23) проводят методом седиментации в градиенте плотности фиколл-урографина (метод позволяет удалять из клеточной смеси мертвые клетки).

• Смешать 3 мл обработанной антикоагулянтном крови с равным объемом фосфатно-солевого буфера в пробирке на 10 мл.

- Внести 4 мл раствора фиколл-урографина ($\rho = 1,077$ г/мл) в центрифужную пробирку.

- Тщательно (по стеночке) наслоить 6 мл разведенной крови на фиколл-урографин. Не смешивать образец с градиентом плотности.

- Центрифугировать 45 мин при 3000 об / мин и температуре 18-20°C.

- В результате проба разделяется на 4 отдельные фракции: 1 фракция на дне пробирки содержит эритроциты и обломки клеток крови. 2 фракция – это раствор фиколл-урографина. 3 фракция, расположенная над градиентом, представляет собой суспензию лимфоидных клеток. 4 фракция образована плазмой с тромбоцитами.

- Слой лимфоцитов осторожно собрать по всей площади сечения пробирки, перенести в чистую, сухую центрифужную пробирку и разбавить ФСБ в соотношении 1:1.

- Содержимое пробирки центрифугировать 10 мин при 3000 об / мин.

- Надосадочную жидкость удалить, а полученный осадок ресуспендировать в ФСБ.

- Содержимое пробирки центрифугировать 10 мин при 3000 об / мин.

- Надосадочную жидкость удалить, а осадок ресуспендировать в среде, выбранной для опыта.

- Клетки подсчитать с помощью камеры Горяева и довести их концентрацию до 2×10^6 клеток/мл.

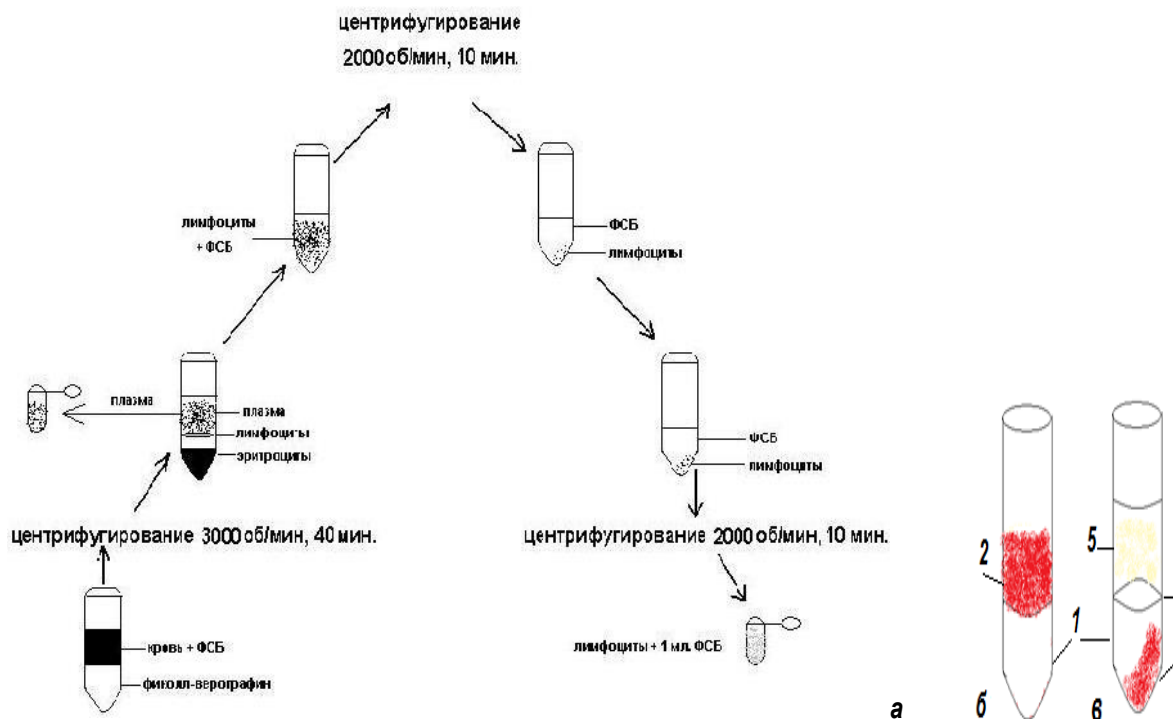


Рис. 23. Схема разделения форменных элементов крови на градиенте плотности фиколл-урографин (а); б – проба до центрифугирования крови, в – после центрифугирования крови. 1 – градиент плотности фиколл-урографин, 2 – кровь, 3 – эритроциты, 4 – лимфоциты, 5 – плазма крови.

Подсчет клеток с помощью счетной камеры

Число клеток в единице объема можно определить из клеточной суспензии с помощью камеры Горяева и светового микроскопа.

Рекомендации! Вымойте счетную камеру и протрите ее с помощью сухой мягкой бумаги или оставьте для высыхания на воздухе. Тщательно притрите покровное стекло к камере Горяева до появления концентрических колец.

Разведите клетки с учетом желаемого объема. Клеточная суспензия должна быть разбавлена так, чтобы клетки легко можно было подсчитать, но, с другой стороны, должно быть достаточное количество клеток для подсчета, чтобы получить достоверный результат. Клетки не должны формировать большие скопления или накладываться друг на друга. Осторожно размещайте клеточную суспензию и поднесите пипеткой Пастера или другой пипеткой примерно 15 мкл суспензии клеток к краю покровного стекла. Площадь под покровным стеклом заполняется под действием капиллярных сил. Достаточное количество жидкости должно быть введено так, чтобы поверхность счетной камеры была лишь покрыта жидкостью, но не выходила из под покровного стекла.

В камере не должно быть пыли или пузырьков воздуха. Если клетки находятся в комке, каждую клетку в комке следует посчитать. Считать клетки, которые находятся "в квадратах", или если они находятся на пересечении верхней или правой границы квадрата, и не учитывать клетки, которые находятся "за квадратом" или на пересечении нижней и левой границы.

Клетки подсчитываются под световым микроскопом с использованием соответствующего увеличения.

Камера Горяева состоит из толстого предметного стекла с нанесенными на них поперечными прорезями, образующими три поперечно расположенные плоские площадки. Средняя площадка продольной прорезью разделена на две, каждая из которых имеет выгравированную на ней сетку. По обе стороны средней площадки в камере Горяева расположены две других на 0,1 мм выше средней. Плоскости этих площадок служат для притирания покровного стекла до появления так называемых «Ньютоновских колец». После притирания покровного стекла создается камера, закрытая с двух боковых сторон, а с двух других остаются щели (капиллярные пространства), через которые и заполняют камеру.

Постоянной величиной во всех сетках является так называемый «малый квадрат», сторона которого равна $1/20$ мм, следовательно, его площадь равна $1/400$ мм². Сетка Горяева (рис. 24) содержит 225 больших квадратов (15 рядов

по 15 больших квадратов в каждом), разграфленных вертикально, горизонтально, крест на крест и неразграфленных.

При работе с камерами их рабочие поверхности должны быть чистыми и сухими. Во время подсчета форменных элементов недопустимо наличие пузырей воздуха на сетке камеры, так как это мешает точности подсчета. Подсчет форменных элементов производится по формуле, $x = (a \times 400 \times v) / b$, где x — искомое количество форменных элементов в 1 мм³; a — сумма форменных элементов, сосчитанных в определенном объеме камеры; b — количество сосчитанных малых квадратов; v — разведение.

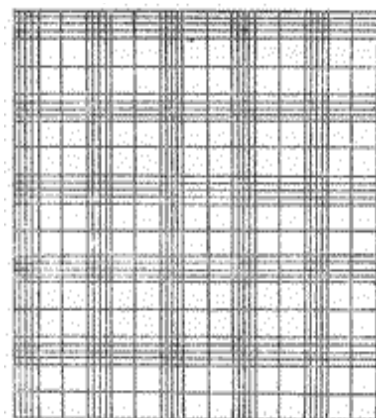


Рис.24. Сетка камеры Горяева

Количество клеток в 1 мл равно: числу клеток в посчитанных квадратах деленное на число не посчитанных квадратов умноженное на 10⁴ и умноженное на фактор разведения

$$N_{\text{клеток в 1 мл}} = \frac{N_{\text{клеток в посчитанных квадратах}}}{N_{\text{не посчитанных квадратов}} \times 10^4} \times \text{фактор разведения}$$

Определение жизнеспособности клеток

Описанная процедура позволит точно определить жизнеспособность клеток. Жизнеспособность клеток рассчитывается как количество жизнеспособных клеток, поделенное на общее число клеток в камере Горяева. Клетки, окрашенные трипановым синим, считаются нежизнеспособными. Этот краситель не проникает через мембраны живых клеток, но при их повреждении способен окрашивать клеточное ядро.

Необходимые реагенты, материалы и оборудование:

- Реагенты: трипановый синий; фосфатно-солевой буфер (состав см. стр.38).
- Материалы и оборудование: пробирки типа Eppendorf; стерильные наконечники; камера Горяева.

Протокол:

- Приготовить 0,4%-ный раствор трипанового синего в буферном изотоническом солевом растворе, рН 7,2- 7,3 (фосфатно-солевой буфер).
- Добавить 0,1 мл раствора трипанового синего к 1 мл клеток.

- 10 мкл окрашенной клеточной суспензии внести под покровное стекло и исследовать непосредственно под микроскопом при малом увеличении.

- Посчитать количество окрашенных в синий цвет ($N^{c.k.}$) клеток и общее количество клеток (N^{Σ}). Жизнеспособность клеток ($\%N^{ж.к.}$) должна быть не менее 95% для здоровых культур лог-фазы:

$\% \text{ жизнеспособных клеток} = [1,00 - (\text{Количество синих клеток} - \text{Общее количество клеток})] \times 100$, т.е. $\%N^{ж.к.} = [1,00 - (N^{c.k.} - N^{\Sigma})] \times 100$.

Чтобы вычислить количество жизнеспособных клеток на мл культуры, использовать формул:

$\text{Количество жизнеспособных клеток} \times 10^4 \times 1,1 = \text{числу клеток} / \text{мл культуры}$, т.е. $N^{ж.к.} \times 10^4 \times 1,1 = N^{ж.к.}_{мл}$

Помните о коэффициенте разбавления для корректировки результатов!

Определение апоптоза и аутофагии в клетках методом просвечивающей электронной микроскопией

Электронная микроскопия считается наиболее надежным способом получения информации об ультраструктуре клеток и их содержании. Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ) предполагает изучение тонких срезов образцов с помощью пучка электронов, проходящих сквозь них и взаимодействующих с ними. Благодаря меньшей чем у света длине волны электронов ПЭМ позволяет изучать образцы с разрешением в десятки тысяч раз превосходящим разрешение самого совершенного светоптического микроскопа. С помощью ПЭМ возможно изучение объектов даже на атомарном уровне. ПЭМ является одним из основных методов исследования в целом ряде прикладных областей: физике, био-медицине, химии, минералогии, материаловедении и нанотехнологий.

Необходимые реагенты, материалы и оборудование:

- Реагенты: фосфатный буфер, фиксатор (обычно глутаровый альдегид или смесь глутарового альдегида и параформальдегида), тетраоксид осмия, буферный раствор, спирт, ацетон, эпоксидная смола.

- Материалы и оборудование: термостат суховоздушный Binder BD53, магнитная мешалка с подогревом BioSan MSH-300, шейкер BioSan Multi Bio 3D, минирокер-шейкер BioSan MR-1, дозаторы одноканальные переменного объёма 2-20 мкл, 20-200 мкл, 100-1000 мкл, наконечники для дозаторов, пастеровские пипетки, эппендорфы, пеницилинки или вials.

Буферные растворы:

1. 0,1М фосфатный буфер, pH 7,4 (на 100 мл):

Маточный раствор А: навеску 2,758 г кристаллического дигидрофосфата натрия растворить в 70 мл дистиллированной воды, довести объем до 100 мл.

Маточный раствор Б: навеску 2,838 г сухого гидрофосфата натрия растворить в 70 мл дистиллированной воды, довести объем до 100 мл.

Для получения буфера рН 7,4 смешать 19 мл раствора А и 81 мл раствора Б. Измерить рН, довести до необходимого рН добавлением раствора Б по капле.

Протокол:

- Клетки зафиксировать в 2,5% глутаровом альдегиде, приготовленного на фосфатном буфере (0,1 М, рН 7.4) путем добавления 1 мл фиксатора к клеточному осадку при постоянном смешивании на вортексе. * В глутаровом альдегиде клетки можно хранить не более 1 месяца.

- Материал промыть фосфатным буфером 4 раза по 5-15 мин. Отмытый материал можно хранить в холодильнике до 2 недель.

- Постфиксировать образец в 0.5-2% растворе OsO₄ 45 минут - 2 часа при комнатной температуре или до 16 ч. при +4°C.

- Образец промыть буфером и/или водой 3-4 раза по 5-10 мин. Отмытый образец можно хранить в холодильнике 1-2 дня.

- Образец можно дополнительно контрастировать 0.5-2.5% раствором ацетатом урана на воде 30 мин., хорошо отмыть водой после постфиксации тетраоксидом осмия или 0.5-2.5% раствором ацетатом урана на 70% этаноле 30-90 мин. во время обезвоживания после 70% спирта.

- Для обезвоживания провести материал через серию спиртов возрастающих концентраций (30%), 50%, 70%, 95%, инкубируя в каждом растворе по 5-10 мин., смесь спирт:ацетон в соотношении 1:1 два раза по 5-10 мин., обезвоженный ацетон 2 раза по 5-10 мин. Обезвоживание и последующее заключение в смолу лучше проводить на качалке BioSan Multi Bio 3D или BioSan MR-1.

- Для заключения в эпоксидную смолу провести материал через серию разведений смолы в ацетоне (10%), 30%, 50%, 70%, 100%, увеличивая время инкубации в каждой смоле от 15-30 мин. до 1-4 ч. В последней смоле можно выдержать 16 ч. (ночь).

- Перенести образец в свежую смолу (разложить по ванночкам или капсулам) для полимеризации. Выдержать ночь при комнатной температуре или при 45°C.

- Полимеризовать блоки согласно указаниям производителя смолы. Для придания готовым блокам большей твердости можно после извлечения из термостата их поместить на короткое время в морозилку, для придания

большой пластичности – выключить термостат и оставить в нем блоки до полного остывания.

- Нарезать образец на ультратонкие срезы (50 нм – 60 нм) на микротоме Leica (Германия) и окрасить 20 минут насыщенным водным раствором 2 % уранилацетата и 5 минут 0,4 % цитратом свинца

- Визуализировать ультраструктуру органелл, участвующих в апоптозе и аутофагии фотографированием в HR-ТЕМ режиме на просвечивающем электронном микроскопе Hitachi HT 7700 Excellence при ускоряющем напряжении 100 кэВ с разрешением 0,144 нм.

Проточная цитометрия

Исследование апоптоза клеток на проточном цитометре

Исследование апоптоза с использованием нескольких методов, включает:

- определение фрагментации ДНК по выявлению гиподиплоидного пика при окраске PI

- выявление экспрессии фосфатидилсерина на поверхности клеток флуоресцентной меткой мероцианином 540 (MC540) и аннексином V

- измерение митохондриального потенциала клеток по интенсивности флуоресценции CMX-Ros.

Необходимые реагенты, материалы и оборудование:

- Образцы клеток (приблизительная оптимальная концентрация образца 2×10^5 - 1×10^6 клеток/мл).

- Реагенты: индуцирующий агент (например, дексаметазон), фосфатно-солевой буфер (ФСБ), флуоресцентные красители (CMX-Ros (Molecular Probes), пропидий йодид, Alexa Fluor 488 аннексин V), диметилсульфоксид (ДМСО), йодистый пропидий (исходный раствор 50 мкг/мл), рибонуклеаза I (исходный раствор 100 мг/мл).

- Материалы и оборудование: стерильные пробирки типа Falcon, полистирольные пробирки 12x75 мм (Falcon 2052) для проточного цитометра, стерильные наконечники, центрифуга типа Eppendorf 5804, проточный цитометр BD FACSCalibur.

1. Анализ клеточного цикла с помощью проточной цитометрии путем окрашивания ДНК йодистым пропидием (PI). Анализ клеточного цикла – один из методов изучения пролиферативной активности клеток. С помощью метода исследуются фазы клеточного цикла: оценивается распределение клеток по G1/G0-, S- и G2/M-фазам клеточного цикла путем определения относительного содержания ДНК в клетках при помощи ДНК-связывающих

флуоресцентных красителей, таких как PI (йодистый пропидий), 7-AAD (7-аминоактиномицин), DAPI (4'6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI)), Hoechst, SybrGreen и др. С помощью данного метода можно анализировать только клеточные суспензии, что является одним из ограничительных факторов метода.

Протокол:

- Собрать клетки в пробирку и отмыть несколько раз в ФСБ.
- Провести фиксацию клеток в холодном 70% этаноле: Осадить клетки; удалить буфер; перемешивая клетки на вортекте, медленно добавлять этанол. Таким образом, происходит фиксация всех клеток и предотвращается образование слипшихся масс. Оставить фиксироваться клетки в этаноле на 30 мин при 4°C.

- Отмыть клетки от этанола в ФСБ (2 раза): отцентрифугировать клетки на скорости 850 g, осторожно слить супернатант, избегая потери клеток, особенно после первой отмывки от этанола. Оставить часть клеток в качестве отрицательного контроля (неокрашенные клетки).

- Обработать клетки рибонуклеазой I: добавить 50 мкл исходного раствора рибонуклеазы I (100 мг/мл). Это обеспечит связывание только ДНК с красителем, но не РНК.

- Добавить 200 мкл исходного раствора PI (100 мг/мл).

Анализ образца на проточной цитрофлуориметре:

- Настроить прибор с помощью неокрашенных клеток.
- Найти и гейтировать исследуемый образец на гистограмме FSC-A (прямое светорассеяние) против SSC-A (боковое светорассеяния).

- Отделить синглеты на гистограмме SSC-H (высота сигнала бокового светорассеяния) против SSC-W (ширина сигнала бокового светорассеяния).

- Провести анализ фаз клеточного цикла на гистограммах FSC-A против PI; PI-W (ширина сигнала флуоресценции PI) против PI-A (площадь) сигнала флуоресценции PI); PI против количества клеток.

2. Оценка изменений в клеточной мембране

Изменение в клеточной мембране проводят окрашиванием клеток с помощью флуорохрома мероцианина 540 (MC540), специфически связывающихся с молекулами фосфатидилсерина (ФС). Регистрация клеток с повышенной интенсивностью флуоресценции выявляет экспрессию ФС, что позволяет идентифицировать клетки, находящиеся на стадии апоптоза.

Протокол:

К 1 мл клеточной суспензии, содержащей 1×10^6 кл/мл добавить 5 мкл маточного раствора МС540 (концентрация 1 мг/мл) (конечная концентрация МС540 - 5 мкг/мл).

- Перемешать клеточную суспензию на вортексе и инкубировать в течение 5 минут в темноте при комнатной температуре в полистирольных пробирках 12x75 мм (Falcon 2052).

- Провести регистрацию результатов на втором детекторе FL2 цитометра. На каждый вариант опыта просчитать не менее 10000 клеток. Мёртвые клетки исключить на основании параметров прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния.

3. Измерение величины митохондриального потенциала клеток.

Динамику изменения величины трансмембранного митохондриального потенциала ($\Delta\Psi_m$), являющегося, по мнению большинства исследователей, самым ранним признаком апоптоза, проводят с использованием флюорохрома CMXRos.

Протокол:

- 50 мкг CMX-Ros растворить в 1 мл ДМСО, разлить на аликвоты по 20 мкл и хранить при -25°C (маточный раствор).

- Непосредственно перед окрашиванием клеток к маточному раствору CMX-Ros добавить 40 мкл ФСБ (рН 7.3) и перемешать вортексированием.

- К 1 мл клеточной суспензии, содержащей 1×10^6 кл/мл среды добавить 5 мкл полученного раствора красителя (конечная концентрация CMX-Ros 150 нМ).

- Тщательно перемешать суспензию на вортексе и инкубировать в темноте 30 минут при 37°C в полистирольных пробирках для цитофлуориметрии 12x75 мм (Falcon 2052).

- Провести регистрацию результатов на третьем детекторе флюоресценции FL3 (красная область спектра). На каждый вариант опыта просчитать не менее 10000 клеток. Мёртвые клетки исключить из исследования на основании параметров их прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния.

4. Анализ апоптоза / некроза путем двойного окрашивания AnnexinV/PI.

Alexa Fluor 488 Annexin V и PI для проточной цитометрии обеспечивают быстрый и удобный тест на апоптоз. Приведенный метод, оптимизирован с использованием Jurkat клеток, клон человеческих T-клеток, обработанные камптотецином, индуцирующий апоптоз. Некоторые

изменения могут быть необходимы для работы с другими типами клеток. Потому как в различных объектах определяют разные параметры апоптоза, настоятельно рекомендуется использовать сочетание различных измерений для надежного обнаружения апоптоза.

Протокол:

- Индуцировать апоптоз в клетках. Подготовить отрицательный контроль путем инкубации клеток в отсутствие индуцирующего агента.

- Отмыть клетки после инкубационного периода в холодном ФСБ.

- Подготовить 1×аннексин-связывающий буфер. Например, для ~ 10 анализов, к 1 мл 5×аннексин-связывающего буфера добавить 4 мл деионизированной воды.

- Подготовить 100 мкг/мл рабочего раствора пропидий йодида путем разбавления 5 мкл (1 мг/мл) исходного раствора PI в 45 мкл 1×аннексин-связывающего буфера. Сохранить не использованную часть этого рабочего раствора для будущих экспериментов.

- Центрифугировать клетки для промывки (аналогично пункту 2), отбросить супернатант и ресуспендировать клетки в 1×аннексин-связывающем буфере. Подсчитать количество клеток и развести в 1×аннексин-связывающем буфере до 1×10^6 клеток/мл, развести в достаточном объеме, чтобы иметь 100 мкл на анализ.

- Добавить 5 мкл Alexa Fluor 488 аннексина V и 1 мкл рабочего раствора PI (100 мкг / мл) (подготовленный на шаге 4) на каждые 100 мкл суспензии клеток

- Инкубировать клетки при комнатной температуре в течение 15 мин.

- По окончании инкубационного периода, добавить 400 мкл 1×аннексин-связывающего буфера, аккуратно перемешать и держать образцы на льду.

- Как можно скорее провести анализ окрашенных клеток методом проточной цитометрии, измерение флуоресценции при 530 нм (FL1 канал) и > 575 нм (FL3 канал).

Популяция клеток должна разделиться на три группы: живые клетки показывают только низкий уровень флуоресценции, апоптотические клетки показывают зеленую флуоресценцию, и мертвые клетки показывают красную и зеленую флуоресценцию.

Детекция программированной клеточной гибели с использованием флуоресцентного микроскопа

Необходимые реагенты, материалы и оборудование:

- Образцы клеток (приблизительная оптимальная концентрация образца $2 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ клеток/мл).
- Индуцирующий агент (например, дексаметазон), фосфатно-солевой буфер (ФСБ), флуоресцентный краситель (например, пропидий йодид, Alexa Fluor 488- аннексин V), дистиллированная вода,
- стерильные пробирки типа Falcon, стерильные наконечники, центрифуга типа Eppendorf 5804, конфокальный микроскоп Olympus IX83.

Протокол

Приведенный метод, оптимизирован с использованием Jurkat клеток, обработанные камптотецином, индуцирующий апоптоз. Необходимы некоторые изменения для адгезивных клеток.

• Индуцировать апоптоз в клетках. Подготовить отрицательный контроль путем инкубации клеток в отсутствие индуцирующего агента.

• После инкубационного периода, промыть клетки в холодном ФСБ.

• Подготовить $1 \times$ аннексин-связывающий буфер. Например, чтобы сделать 1 мл $1 \times$ буфера, добавить к 200 мкл $5 \times$ аннексин-связывающего буфера (Компонент С) 800 мкл деионизированной воды.

• Подготовить 100 мкг/мл рабочего раствора путем разбавления PI 5 мкл исходного раствора PI (1 мг/мл) (компонент Б) в 45 мкл $1 \times$ аннексин-связывающего буфера. *Примечание!* Неиспользованную часть этого рабочего раствора сохранить для будущих экспериментов.

• Промыть клетки центрифугированием (аналогично пункту 2), отбросить супернатант и ресуспендировать клетки в $1 \times$ аннексин-связывающем буфере. Подсчитать число клеток и разбавить их в аннексин-связывающем буфере до 1×10^6 клеток / мл, подготовить достаточный объем для нанесения на слайд.

• Добавить 5-25 мкл конъюгированного аннексин V (компонент А) и 1-2 мкл рабочего раствора PI (100 мкг/мл) (подготовленный на шаге 4) на каждые 100 мкл суспензии клеток. Более высокие концентрации конъюгированного аннексина V, как правило, дают лучшие результаты; оптимальную концентрацию для окрашивания необходимо определить опытным путем.

• Инкубировать клетки при комнатной температуре в течение 15 минут.

• Промыть клетки с $1 \times$ аннексин-связывающим буфером.

• Перенести клетки на слайды, посчитать их с использованием желаемого метода и визуализировать флуоресценцию с помощью соответствующих фильтров.

Клетки должны разделиться на три группы: живые, апоптотирующие и мертвые. Живые клетки показывают лишь слабое окрашивание клеточной мембраны аннексином V, в то время как апоптотические клетки показывают значительно более высокую степень маркировки поверхности. Для мертвых клеток характерно окрашивание мембраны аннексином V и сильное окрашивание ядра пропидием йодида.

Выделение ДНК из клеток (высокосолевой метод)

Необходимые реагенты, материалы и оборудование:

- Реагенты: EDTA; изопропанол; фосфатно-солевой буфер (ФСБ); хлорид Na (NaCl); 3М ацетат Na (pH 5,2); 10% додецилсульфат Na (SDS); трис-EDTA (TE), pH 7.4; трис-HCl, pH 8.0; абсолютный этанол; Протеиназа K;
- Материалы и оборудование: пробирки типа Eppendorf, центрифуга типа Eppendorf 5815, термостат, вортекс.

Буферные растворы

1. Раствор протеиназы K: 100 мг протеиназы K растворить в 10 мл Трис-EDTA, pH 7.4.
2. Лизирующий буфер (на 100 мл): 1 мл Трис-EDTA (pH 8.0), 8 мл NaCl (5 M), 0,4 мл EDTA (0.5 M), довести объем dH₂O до 100 мл.
3. 6M хлорид натрия: 3,5 г NaCl растворить в 10 мл dH₂O.

Протокол:

А. Лизис полученных клеток

- Центрифугировать культивируемые клетки в течение 10 мин при 10 ° C (1200 об / мин).
- Удалить супернатант и ресуспендировать осадок клеток два раза 1× PBS по 10 мл центрифугированием.
- Ресуспендировать осадок в 10 мл буфера для лизиса ядер.
- Центрифугировать осадок в течение 10 мин при 10 ° C (1200 об / мин). Удалить супернатант.
- Добавить 3 мл буфера для лизиса ядер, ресуспендировать осадок.
- Добавить 100 мкл протеиназы K (10 мг / мл) и 400 мкл 10% SDS. Слегка встряхнуть и инкубировать в течение ночи при 37 ° C.
- *В. Осаждение в соли высокой концентрации*
- К лизату добавить 1 мл 6 M NaCl.
- Смешать энергично в течение 15 сек.
- Центрифугировать при 3000 об / мин в течение 15 мин.

- Перенести супернатант в новую пробирку и центрифугировать при 3000 об / мин в течение 15 мин.

- Повторить шаги 9 и 10 пока пробирка не очиститься от соли (по крайней мере 3-4 раза).

С. Осаждение этанолом

- 12. Перенести супернатант в новую пробирку; измерить объем супернатанта.

- 13. Добавить 1 / 10 от общего объема 3 М ацетата натрия (рН 5,2) и 2.5-3 раза от общего объема холодного 100% изопропанола.

- 14. Слегка встряхнуть, пока ДНК не осядет.

- 15. Перенести ДНК в новую пробирку, содержащую 13 мл 70% этанол.

- 16. Перенести пробирки в вортекс и инвертировать в течение 2 часов, чтобы тщательно промыть.

- 17. Перенести ДНК в новую пробирку типа Эппендорф (1,5 мл) и центрифугировать в течение 30 мин при 14000 об / мин.

- 18. Высушить осадок в течение 5 мин.

- 19. Добавить 200 мкл dH₂O и ресуспендировать при 37 ° С в течение ночи.

- 20. Измерить концентрацию ДНК и пустить 1-5 мкл (приблизительно 200нг) ДНК на гель-электрофорез в агарозном геле (1%) в 1× ТЕ буфере. Измерить ДНК с помощью NanoDrop и распечатать результаты для дальнейшего использования.

Выделение ДНК из клеток (фенольный метод)

Необходимые реагенты, материалы и оборудование:

- Реагенты: 10× и 1× Фосфатно-солевой буфер; 10% додецилсульфата натрия (SDS); 0,5 М ЭДТА; хлороформ; фенол; изоамиловый спирт; 100% этанол; 3 М ацетат натрия (рН 5,2); 1 М Трис-НСl (рН 8,0); 1× ТЕ буфер; дистиллированная вода; протеиназа К.

- Материалы и оборудование: пробирки типа Eppendorf, центрифуга типа Eppendorf 5815; термостат; вортекс.

Буферные растворы

1. Сахарозный буфер (на 1 литр): 109, 5 г сахарозы, 10 мл тритон X-100, 5мл MgCl₂ (1М), 10 мл Tris-НСl (1М рН 7,6), 1мл ZnSO₄ (0,1М), 0,4 мл EGTA (0,5М), 10 мл PMSF (0,1М) и добавить дистиллированную воду до 1 л. Хранить в холодильнике при +4°С.

2. Фосфатно-солевой буфер (ФСБ) (рН 7,2-7,6): 8,09мМ Na₂HPO₄, 1,47 мМ KH₂PO₄, 2,68 мМ KCl, 136,72 мМ NaCl.

3. Буфер для протеиназы К (на 100 мл): 1мл трис-НСl (1М, рН 10,5), 200 мкл 0,5 М Na₂-ЭДТА (рН 8,0), 15 мл NaCl (1М) довести объем до 100 мл. Готовый раствор хранить в холодильнике при +4°С.

4. ТЕ буфер (ДНК-буфер) (на 1 литр): 10 мл Трис-НСl (1М, рН 7,4), 2 мл Na₂-ЭДТА (0,5М). Готовый раствор хранить в холодильнике при +4°С.

Протокол

• В чистые полипропиленовые пробирки типа Eppendorf объемом 1,5 мл внести примерно 500 мкл суспензии лимфоцитов и 1 мл денатурирующего раствора холодного сахарозного буфера и инкубировать 10 мин при комнатной температуре. **Добавление сахарозного буфера приводит к лизису эритроцитов и клеточной мембраны лимфоцитов, при этом ядерная мембрана остается интактной.*

• 2. Образец центрифугировать при 3000 об/мин, при 4°С в течение 15 мин.

• 3. Слить супернатант и ресуспензировать ядерный осадок в 400 мкл буфера для протеиназы К и добавить 20 мкл 10% SDS до конечной концентрации 0,5%. **При добавлении SDS происходит лизис ядерной мембраны, ДНК выходит из ядра, и можно визуально наблюдать увеличение вязкости раствора.*

• После 5 мин инкубации добавить 5 мкл маточного раствора протеиназы К с концентрацией 20 мг/мл (конечная концентрация — 250 мкг/мл). Инкубировать с протеиназой К в течение 12 ч при 37°С, либо — 3 ч при 55°С.

• По окончании инкубации добавить 400 мкл забуференного фенола, осторожно перемешать в течение 10 мин и центрифугировать 5 мин при 5000 об/мин. **После разделения фаз ДНК находится в верхней водной фазе, РНК — в фенольной фазе, белки — в интерфазе.*

• Верхнюю водную фазу перенести в другую чистую пробирку и добавить 400 мкл смеси фенол : хлороформ (1:1).

• Перемешать в течение 5 мин и центрифугировать 5 мин при 5000 об/мин.

• Вторично верхнюю водную фазу перенести в другую чистую пробирку и добавить 400 мкл хлороформа.

• Образец перемешать в течение 5 мин и центрифугировать 5 мин при 5000 об/мин.

• Третий раз верхнюю водную фазу перенести в чистую пробирку. К раствору ДНК добавить последовательно 40 мкл 3 М ацетата Na (1/10 объема) и 800 мкл охлажденного 96% этанола (2 объема).

- Осторожно перемешать, наблюдая преципитацию ДНК. Образец центрифугировать при 12000 об/мин в течение 10 мин.

- Промыть осадок 1 мл 70% этанола для удаления соли, используемой при переосаждении ДНК. Образец повторно центрифугировать при 12000 об/мин в течение 5 мин.

- Осадок высушить при комнатной температуре до исчезновения запаха спирта и растворить ДНК в ТЕ-буфере (в течение ночи).

- Концентрация и чистота выделенной ДНК оценивается при измерении оптической плотности (ОП) полученного раствора. Измеряется поглощение образца при 260 и 280 нм по сравнению с поглощением ТЕ-буфера. Для хорошо выделенного образца ДНК отношение $ОП_{(260)}/ОП_{(280)}$ должно быть не менее 1.8. Оптическая плотность раствора геномной ДНК с концентрацией 1 мг/мл соответствует $ОП_{(260)}=20$ оптическим единицам (о.е.).

Образцы выделенной ДНК хранить в виде раствора в ТЕ-буфере при низкой температуре (-20°C).

Выделение ДНК из культуры клеток с использованием коммерческих наборов (на примере набора QIAamp DNA Mini Kit, фирма QIAGEN)

Необходимые реагенты, материалы и оборудование:

- Реагенты: набор реактивов в комплекте: QIAamp spin колонки; собирающие пробирки (2 ml); буфер AL; буфер ATL; буфер AW1; буфер AW2; буфер AE; proteinase K; фосфатно-солевой буфер (ФСБ); этанол (96–100%),

- Материалы и оборудование: стерильные наконечники, пробирки типа Eppendorf, центрифуга типа Eppendorf 5415, термостат, вортекс.

Протокол адаптирован фирмой QIAGEN (www.qiagen.com) с использованием набора QIAamp DNA Mini Kit and QIAamp DNA Blood Mini Kit для выделения ДНК из клеток и крови из минимальных и средних объемов. Время выделения – 30 мин).

- Перемешать клетки с помощью вортекса (Vortex V-1 plus)

- Центрифугировать соответствующее число клеток (максимум 5×10^6 клеток) в течение 5 мин при $300 \times g$ в 1,5 мл микроцентрифужных пробирках. Осторожно полностью удалить супернатант, чтобы не нарушить клеточный осадок.

- Ресуспендировать осадок клеток в ФСБ до конечного объема 200 мкл.

- Добавить 20 мкл QIAGEN протеазы или протеиназы К.

- Добавить 200 мкл буфера AL к образцу. Перемешать на вортексе в течение 15 с. Для обеспечения эффективного лизиса, важно, чтобы образец и буфер AL были тщательно перемешаны до получения однородной взвеси.

Примечание! Если объем образца больше 200 мкл, увеличьте количество QIAGEN протеазы (или протеиназы K) и буфера AL пропорционально (например, для 400 мкл образца потребуется 40 мкл QIAGEN протеазы (или протеиназы K) и 400 мкл буфера AL). Если объем образца превышает 400 мкл, то потребуется использование колонки QIAamp для ДНК крови среднего или максимального объема, которые могут обрабатывать до 2 мл или до 10 мл образца, соответственно.

- Инкубировать при 56 °С в течение 10 мин. Выход ДНК достигает максимума после лизиса в течение 10 мин при 56 °С. Более длительные сроки инкубации не влияют на количество и качество очищенной ДНК.

- Не теряя времени, отцентрифугируйте 1,5 мл микроцентрифужные пробирки для удаления капель с внутренней стороны крышки.

- Добавить 200 мкл этанола (96-100%) в образец и снова перемешать на вортексе в течение 15 с. После смешивания, не теряя времени отцентрифугируйте 1,5 мл микроцентрифужные пробирки для удаления капель с внутренней стороны крышки.

Примечание! Если объем образца больше 200 мкл, увеличьте количества этанола пропорционально, например, для 400 мкл образца потребуется 400 мкл спирта.

- Осторожно перенести смесь, полученную на этапе 8, в колонку QIAamp для центрифугирования (в 2 мл собирающую пробирку) не дотрагиваясь до края, закрыть крышку и центрифугировать при 6000× g (Eppendorf 5415) в течение 1 мин.

- Перенести колонку QIAamp для центрифугирования в чистую 2 мл собирающую пробирку и выбросить старую пробирку, содержащую фильтрат. (Закрыть каждую колонку, чтобы избежать образования аэрозоля во время центрифугирования).

- Центрифугирование осуществляется при 6000× g, чтобы снизить уровень шума. Центрифугирование на более высокой скорости, не влияет на выход или чистоту ДНК. Если лизат полностью не прошел через колонку, центрифугирование повторить на более высокой скорости, пока колонка не опустеет.

Примечание! При выделении ДНК из лимфоцитов, рекомендуется центрифугировать на полной скорости, чтобы избежать засорения.

- Аккуратно открыть колонку QIAamp и добавить 500 мкл буфера AW1 не дотрагиваясь до края колонки. Закрыть крышкой и центрифугировать при

6000× g в течение 1 мин. Перенести колонку QIAamp в чистую 2 мл пробирку (прилагается), и выбросить старую пробирку, содержащую фильтрат.

- Аккуратно открыть колонку QIAamp и добавить 500 мкл буфера AW2 не дотрагиваясь до края колонки. Закрыть крышку и центрифугировать на полной скорости (20,000 × g или 14000 об / мин) в течение 3 мин.

- (По желанию): Перенести колонку QIAamp в новую 2 мл пробирку и отбросить старую пробирку с фильтратом. Центрифугировать на полной скорости в течение 1 мин.

- Перенести колонку QIAamp в чистую 1,5 мл пробирку. Аккуратно открыть колонку QIAamp и добавить 200 мкл буфера AE или дистиллированной воды. Инкубировать при комнатной температуре в течение 1 мин, а затем центрифугировать при 6000 × g в течение 1 мин. *Примечание! Инкубация с буфером AE или водой в течение 5 минут при комнатной температуре до центрифугирования ДНК обычно увеличивает выход. Второй шаг элюирования с еще 200 мкл буфера AE будет повышать выход до 15%.*

Рекомендуется для образцов, содержащих менее 1 мкг ДНК, элюция в 50 мкл буфера AE или воды. Для длительного хранения ДНК, рекомендуется элюировать с помощью буфера AE и хранить при температуре -20 ° C, так как ДНК, хранящаяся в воде подлежит кислотному гидролизу. *Примечание!* 200 мкл образца цельной человеческой крови (5×10^6 лейкоцитов / мл) обычно дает 6 мкг ДНК в 200 мкл воды (30 нг/мкл) с отношением 1.7-1.9 при A260/A280.

Электрофорез и анализ апоптотической ДНК-лестницы в агарозном геле.

Необходимые реагенты, материалы и оборудование:

- Реагенты: агароза, электродный буфер (ТБЕ буфер), дистиллированная вода.

- Материалы и оборудование: стерильные наконечники, пробирки типа Eppendorf, центрифуга типа Eppendorf 5415, термостат, вортекс, горизонтальная камера для электрофореза, источник питания (PowerPac HC, Bio-Rad, Сингапур).

Буферные растворы:

1. Электродный буфер (ТБЕ): 45мМ трис-ОН, 1,25мМ Na₂-ЭДТА, 4,5мМ борная кислота, рН=8,3.

Протокол

- Для проведения электрофореза ДНК приготовить 10X буфер трис-борная кислота-ЭДТА (ТБЕ). Буферный раствор для электрофореза храниться при температуре +4 °С не более 1 месяца. Для приготовления агарозного геля и использования в качестве электродного буфера 10-х ТБЕ развести его в 10 раз.

- На уравновешенный столик установить форму для заливки геля. Не касаясь дна формы (1 мм), поместить гребенки.

** Для приготовления 1% агарозного геля в СВЧ-печи расплавить до прозрачного состояния раствор агарозы (растворить 1г агарозы в 100мл ТБЕ буфера для электрофореза), не допуская закипания геля.*

- Расплавленную смесь охладить до температуры +50–60 °С;

- С помощью автоматического дозатора добавить бромистый этидий до конечной концентрации 0,5 мкг/мл, тщательно перемешать и залить на пластинку так, чтобы зубцы гребенок были погружены не менее, чем на 3 мм, не допуская образования пузырьков воздуха.

- После полного застывания геля в течение 30 мин при температуре 18–25 °С осторожно извлечь гребенку плавным движением вверх, избегая повреждения образовавшихся лунок.

- Установить пластинку с агарозным гелем в камеру для электрофореза и заполнить ТБЕ-буфером так, чтобы буферный раствор полностью покрывал пластинку.

- Исследуемые образцы ДНК в объёме 5 мкл смешать с 1 мкл загрузочного буфера DNA Gel Loading Dye (6X) (Thermo Fisher, США) и внести в лунки агарозного геля под буферный раствор. Закрыть камеру для электрофореза, электроды подсоединить к источнику тока и установить напряжение 100В на 45 минут.

- Результаты электрофореза ДНК в агарозном геле регистрировать в ультрафиолетовом свете при 290–330 нм при облучении геля с помощью УФ-трансиллюминатора гельдокументирующей системы ChemiDoc (Bio-Rad, Сингапур). Фрагменты анализируемой ДНК проявляются в виде светящихся оранжево-красных полос.

Вестерн-блотт анализ белков, ассоциированных с апоптозом и аутофагией

Для разделения клеточных белков используют метод электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфат натрия (Laemmli, 1970).

Необходимые реагенты, материалы и оборудование:

•Реагенты: фосфатно-солевой буфер, Tween20, буфер для проб, буфер для электрофореза, акриламид, бисакриламид, трансфер буфер, сухое молоко, первичные кроличьи моноклональные антитела против LC3В белка, вторичные антикроличьи моноклональные антитела конъюгированные с пероксидазой хрена, первичные мышинные моноклональные антитела против белка каспаза-3, первичные мышинные моноклональные антитела против белка Bcl-2, вторичные антимышинные антитела конъюгированные с пероксидазой хрена, Novex ECL Chemiluminescent Substrate Reagent Kit.

•Материалы и оборудование: стерильные наконечники, пробирки типа Eppendorf, центрифуга типа Eppendorf 5415, термостат, вортекс, ультразвуковой дезинтегратор (UP100H, Hielscher, Германия), вертикальная камера для электрофореза MINI-Protean TETRA, ячейка для блота Mini Trans-Blot, источник питания (PowerPac HC, Bio-Rad, Сингапур), гель- и хемидокументирующая система ChemiDoc™ XRS+, весы аналитические (ER-182A A&D, Япония), генератор льда (Porkka, Финляндия), спектрофотометр Nanodrop (ND-2000, Thermo Scientific), водяная баня (Россия), pH метр (Hanna Instruments, Румыния).

Буферные растворы:

1. Фосфатно-солевой буфер (ФСБ) (pH 7,2-7,6): 8,09мМ Na₂HPO₄, 1,47 мМ KH₂PO₄, 2,68 мМ KCl, 136,72 мМ NaCl.
2. Фосфатно-солевой буфер с твином (ФСБ-Т) (pH 7,4): 1×ФСБ, 0,1% Твин-20.
3. Буфер для проб: 62,5мМ трис-HCl (pH 6,8), 2% SDS, 10% глицерин, 50мМ DTT, 0,01% бромфеноловый синий.
4. Буфер для электрофореза по LAEMMLI: 0,025М Трис, 0,1% SDS, 0,192М глицин.
5. Запасной раствор акриламид/метиленбисакриламид: 30% акриламида, 0,7% метиленбисакриламида.
6. Трансфер буфер: 25мМ трис, 0,2М глицин, 20% метанол (pH 8,5).
7. Блокирующий буфер для вестерн блота: 1×ФСБ-Т (pH 7,4), 5% сухое молоко.
8. Блокирующий буфер для приготовления первичных кроличьих моноклональных антител: 1% бычий сывороточный альбумин (БСА), 0,5% Тритон X-100, 0,01М ФСБ (pH 7,4), 0,05% азид-Na.

Приготовление проб:

- Клетки осадить центрифугированием в течение 3 мин, 2000 rpm в угловом роторе (Eppendorf, 5815R), надосадок удалить;
- К осадку добавить 25 мкл 1x SDS-буфера для проб;
- Инкубировать образцы 5 мин при +95°C;
- Затем образцы перенести сразу на лед и хранить при -20°C до использования.

• Перед применением, в случае необходимости, образцы обработать ультразвуком для удаления геномной ДНК, после чего отцентрифугировать в течение 2 мин, 10 000 rpm в угловом роторе (Eppendorf, 5815R).

• Измерить концентрацию белка на спектрофотометре Nanodrop. Добавить 0,5 мкл 1% бромфенолового синего (БФС) к каждому образцу перед внесением в гель.

Постановка электрофореза:

ПААГ электрофорез. Приготовить концентрирующий и разделяющий гели (содержащие 4% и 8% акриламид, соответственно), с использованием 30% акриламида и 0,7% раствора метиленбисакриламида. Для полимеризации гелей используют TEMED и персульфат аммония. Провести электрофорез в вертикальном направлении при силе тока 30mA на гель в электродном буфере.

Перенос. По окончании электрофореза инкубировать гель, нитроцеллюлозную (PVDF) мембрану, фильтровальную бумагу и спонжи в холодном Трансфер буфере в течение 15 мин. Затем собрать сэндвич, заполнить систему для трансфера тем же буфером. Запустить блоттинг с постоянным током 350 mA в течение 1,30 ч для 2 гелей или 45 минут для 1 геля.

Блокировка. После трансфера мембрану промыть 1 раз в течение 5 минут в ФСБ-Т (фосфатно-солевой буфер + Tween20).

• Затем мембрану поместить в 20 мл блокирующего буфера, содержащий 5% сухое молоко и инкубировать 1 час при комнатной температуре на орбитальном шейкере.

• По окончании блокировки мембрану промыть 3 раза по 5 минут в ФСБ-Т, добавить первичные мышинные (либо кроличьи) антитела (против каспазы-3, Bcl-2, Вах, beclin-1 и LC3B), разведенные в 5 мл блокирующего буфера в соответствии с протоколом, и инкубировать в течение ночи при +4°C на орбитальном шейкере.

• После ночной инкубации мембрану промыть 3 раза по 5 минут в ФСБ-Т и добавить вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена,

разведенные в 5 мл блокирующего буфера в соответствии с протоколом. Инкубация - 1 час при комнатной температуре на орбитальном шейкере.

Окрашивание. Мембрану промыть в ФСБ-Т, инкубировать в течение 1 минуты с люминолом на основе хемилюминисцентного субстрата (ECL) и детектировать хемилюминисценцию целевых белков с помощью гель- и хемидокументирующей системы ChemiDoc™ XRS+.

Содержание

	стр
Введение	3
Часть 1. Понятие и классификация программированной клеточной гибели	4
Программированная клеточная гибель по типу апоптоза	6
Программированная клеточная гибель по типу аутофагии	8
Программированная клеточная гибель по типу некроза	13
Часть 2. Методы верификация программированной клеточной гибели	17
Морфологические методы детекции ПКГ	17
Аналитические методы молекулярной биологии, применяемые для детекции программированной клеточной гибели	28
Заключение по разделу	37
Часть 3. Протоколы методов изучения программированной клеточной гибели	41
Клеточные культуры	41
Выделение лимфоцитов на градиенте плотности фиколл-урографин	43
Подсчет клеток с помощью счетной камеры	46
Определение жизнеспособности клеток	47
Определение апоптоза и аутофагии в клетках методом просвечивающей электронной микроскопией	48
Проточная цитометрия. Исследование апоптоза клеток на проточном цитометре	50
Детекция программированной клеточной гибели с использованием флуоресцентного микроскопа	54
Выделение ДНК из клеток (высокосолевого метод)	55
Выделение ДНК из клеток (фенольный метод)	56
Выделение ДНК из культуры клеток с использованием коммерческих наборов	58
Электрофорез и анализ апоптотической ДНК-лестницы в агарозном геле	60
Вестерн-блотт анализ белков, ассоциированных с апоптозом и аутофагией	61