

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ И ПОДХОДЫ К ИЗУЧЕНИЮ АПОПТОЗА В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БИОЛОГИИ

Кудрявцев И.В.¹, Головкин А.С.², Зурочка А.В.³,
Хайдуков С.В.⁴

¹ ФГБУ «НИИ экспериментальной медицины» СЗО РАМН, Санкт-Петербург

² НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний СО РАМН, г. Кемерово

³ Федеральное бюджетное государственное учреждение науки Институт иммунологии и физиологии
Уральского отделения РАН, г. Екатеринбург

⁴ ФГБУ Федеральный Научно-Клинический Центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им.
Дмитрия Рогачева, Москва; ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Резюме. Обзор посвящен анализу методологических подходов, применяемых в настоящее время для изучения апоптоза у беспозвоночных и позвоночных животных при помощи проточной цитофлюориметрии. Процесс апоптоза сопровождается специфическими изменениями морфологии и биохимии клетки, характерными для всех эукариотических клеток. На представителях различных групп животных детально рассмотрены методы и подходы, позволяющие анализировать морфологические изменения клеток и изменения липидного состава их плазматических мембран, определять уровень активации внутриклеточных ферментов и компонентов каскада каспаз, степень фрагментации ДНК, так же как и нарушения функционирования митохондрий. Апоптоз является одним из ключевых механизмов поддержания постоянства внутренней среды многоклеточного организма, и его оценка является необходимой составляющей фундаментальных и прикладных исследований в экспериментальной биологии и иммунологии. Набор методов определения апоптоза достаточно велик, и предпочтение исследователя определяется конкретными задачами и техническими возможностями лаборатории.

Ключевые слова: апоптоз, критерии, методы оценки, межвидовые сравнения.

Kudriavtsev I.V., Golovkin A.S., Zurochka A.V., Khaidukov S.V.

MODERN TECHNOLOGIES AND APPROACHES TO APOPTOSIS STUDIES IN EXPERIMENTAL BIOLOGY

Abstract. This review is focused on analysis of currently used flow cytometric methods designed for identifying apoptotic cells in various invertebrate and vertebrate species. Apoptosis can be characterized by stage-specific morphological and biochemical changes that are typical to all kinds of eukaryotic cells. In this article, we consider different techniques of apoptosis detection based on assessment of cellular morphology and plasma membrane alterations, activation of intracellular enzymes and components of a caspase cascade, as well as DNA fragmentation and failure of mitochondrial transmembrane potential, as assessed in various animal groups. Apoptosis recognized as a key mechanism aiming at maintenance of cellular homeostasis in multicellular organisms, and such investigations represent a necessary component of fundamental and applied studies in diverse fields of experimental biology and immunology. A broad spectrum of apoptosis markers is

Адрес для переписки:

Кудрявцев Игорь Владимирович,
к.б.н., отдел иммунологии,
ФГБУ «НИИЭМ» СЗО РАМН,
197376, Санкт-Петербург, ул. акад. Павлова, 12.
E-mail: igorek1981@yandex.ru

used, and the preference is given to optimal approaches, as determined by experimental tasks, and technical opportunities of the laboratory. (*Med. Immunol.*, 2012, vol. 14, N 6, pp 461-482)

Keywords: apoptosis, criteria, evaluation techniques, interspecies comparisons.

На современном этапе развития биологической науки клетки рассматриваются не только с точки зрения оценки той или иной их функции, но и с точки зрения их жизненного цикла. Жизненный цикл клеток включает в себя: процессы пролиферации, последующей дифференцировки и заканчивается их гибелью, в том числе и путем апоптоза. Апоптоз — это запрограммированная клеточная гибель. Данный термин был предложен группой английских ученых под руководством Джона Керра в 1972 году для описания процесса гибели лимфоцитов под действием глюкокортикоидов [35]. В дословном переводе он означает «опадание листьев» или «отделение лепестков от цветка», что, применительно к клетке, рассматривается как образование апоптотических телец, формирующихся на терминальных стадиях клеточной гибели. Следует также отметить, что в 2002 году Нобелевской премии по физиологии или медицине были удостоены Сидней Бреннер, Джон Э. Салстон и Роберт Г. Хорвиц за «открытие принципов генетического регулирования развития органов и запрограммированного отмирания клеток». Однако, несмотря на столь долгую историю исследований, интерес к механизмам индукции и регуляции процесса программируемой клеточной гибели не ослабевает. Причиной тому служит важнейшая роль этого процесса в различных аспектах функционирования многоклеточных организмов [21]. Помимо элиминации измененных — поврежденных, дефектных, мутантных или инфицированных клеток, посредством апоптоза реализуются процессы дифференцировки и морфогенеза при формировании тканей и органов. Кроме того, осуществляется поддержание клеточного гомеостаза уже сформированного организма, также как и его защита от патогенов при реализации защитных реакций [65]. Следует отметить, что апоптоз, как программируемая клеточная гибель, характерен для всех эукариот, начиная от одноклеточных простейших и заканчивая высшими многоклеточными животными [3, 29, 36]. У большинства эукариот в развитии апоптоза традиционно выделяют три стадии: сигнальную или индукционную, эффекторную и терминальную или деградиационную. Среди морфологических изменений, имеющих место в апоптотизирующей клетке, большинство исследователей выделяет следующие [66, 72, 73]:

- изменение формы клетки, обычно, клетка приобретает шарообразную форму;
- потеря поверхностных структур — микровиллей, псевдоподий и т.д.;

— изменение объема клетки (в зависимости от фазы апоптоза);

— конденсация хроматина в ядре и диссоциация ядрышек;

— фрагментация ядра, конденсация цитоплазмы и формирование «апоптотических» телец на поздних стадиях апоптоза для облегчения фагоцитоза и т.д.;

Отдельного внимания заслуживают биохимические изменения в клетках. К их числу относятся:

— увеличение концентрации и активности проапоптотических белков, в первую очередь, белков семейства bcl-2;

— изменение активности и функций митохондрий (нарушение мембранного потенциала, выход в цитоплазму цитохрома c и других белков, имеющих при физиологических условиях митохондриальную локализацию; увеличение концентрации в цитоплазме активных радикалов кислорода);

— запуск в цитоплазме каскада каспаз;

— нарушение водно-солевого баланса цитоплазмы (например, увеличение концентрации кальция, снижение концентрации воды);

— активация протеолитических ферментов (в первую очередь, различных сериновых протеаз и трансклютаминазы);

— изменение липидного состава поверхностной мембраны клетки;

— дефрагментация цитоскелета, в первую очередь, за счет деполимеризации актиновых филаментов в цитоплазме;

— изменения в структуре ДНК клетки вследствие активации эндонуклеаз и других ферментов (фрагментация, появление одонитевых и низкомолекулярных фрагментов).

При этом каждую из перечисленных выше стадий апоптоза, как и специфические изменения морфологических и молекулярно-биохимических признаков апоптотизирующей клетки, можно оценить при помощи широкого спектра методов, включая проточную цитофлуориметрию. Выбор метода всецело зависит от той цели, которая поставлена перед исследователем.

Оценка морфометрических характеристик клеток при апоптозе

Для изучения морфологических изменений при апоптозе определяют параметры прямого (светорассеяние, измеряемое под углом 1-19°) и бокового светорассеяния (светорассеяние, измеряемое под углом 90°), характеризующие размер и структуру клетки [67]. При запуске апоптоза объем цитоплазмы клетки постепенно уменьша-

ется, что приводит к снижению интенсивности прямого светорассеяния. Одновременно в клетке начинается конденсация хроматина и формирование его скоплений около ядерной мембраны, после чего на последней появляются инвагинации и, в итоге, происходит фрагментация ядра с формированием так называемых «апоптотических телец». Параллельно в цитоплазме происходит увеличение объема компонентов эндоплазматической сети, а также конденсация гранул. Все эти события приводят к тому, что структура клетки усложняется, и, как следствие, значительно повышается сигнал бокового светорассеяния, так как клетка «отражает» больше света в боковом направлении. На завершающих этапах апоптоза — фаза деградации клетки — завершается формирование апоптотических телец, при этом имеет место значительное уменьшение интенсивности обоих параметров светорассеяния. Примеры подобного рода исследований приведены на рисунке 1.

Следует отметить, что подобные методы оценки апоптоза в подавляющем числе случаев себя хорошо зарекомендовали при работе с суспензионными клеточными культурами, например, с клетками линии HL-60 [14] или клетками лимфомы Беркитта [19]. Однако вопрос о целесообразности применения такого подхода при работе с циркулирующими клетками беспозвоночных, обладающих высокой адгезивной активностью, остается до настоящего времени открытым. Также вызывает вопрос оправданность использования подобного метода для исследования апоптоза в клетках адгезионных культур и гомогенатах тканей. Поэтому в сравнительной иммунологии нашли свое применение методы оценки уровня апоптоза, описанные ниже.

Методы и подходы к изучению активности каспаз при апоптозе

Одну из ключевых ролей при инициации апоптоза играют каспазы. Каспазы (от англ. *caspases* — *cysteiny* *aspartate*-specific proteases) — это семейство внутриклеточных цистеиновых протеаз, которые расщепляют аминокислотные последовательности белков-мишеней после остатка аспарагиновой кислоты [10]. Отличительной особенностью семейства каспаз является наличие консервативной последовательности в составе активного центра — пентапептида QACXG (где X — остаток аргинина, глутамина или глицина). В центре данного пентапептида расположен остаток цистеина (еще одно название этой группы ферментов — аспартат-специфичные цистеиновые протеазы), отвечающий за функ-

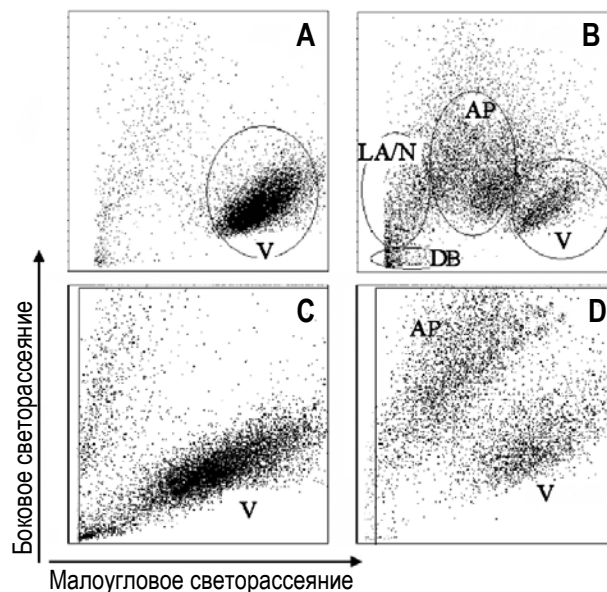


Рисунок 1. Анализ морфометрических характеристик клеток при апоптозе

Примечание. Гистограммы А и В — клетки В-клеточной лимфомы, инкубация которых проходила в отсутствие (А) и присутствии (В) HA14-1 (из [67]); гистограммы С и D — клетки линии Jurkat после 24-часовой инкубации в отсутствие (С) или присутствии антител к CD95 (из [64]). V — живые клетки, AP — клетки, вступившие в апоптоз; LA/N — клетки на стадии позднего апоптоза/некроза; DB — клеточный дебрис.

циональную активность этой группы ферментов. В клетках каспазы синтезируются в виде проформы, состоящей из трех доменов: N-концевого регуляторного домена, а также большой и малой субъединиц. Образование активных форм каспаз происходит при помощи протеолитического расщепления по связям между Asp-Xaa во внутренних сайтах между доменами. В результате этого процесса происходит последовательное высвобождение малой, а потом и большой субъединицы, так и удаление регуляторного домена. Оставшиеся большая и малая субъединицы формируют гетеродимер, который в дальнейшем связывается с аналогичным гетеродимером с образованием тетрамера — активной формы каспазы с двумя каталитическими участками. У различных представителей млекопитающих описано 15 генов, кодирующих каспазы, из которых ферменты с порядковыми номерами 1, 4, 5, 11 и 13 не принимают участие в запуске и реализации программируемой клеточной гибели [17]. Оставшиеся каспазы подразделяют на иницирующие (каспаза-2, -8, -9, -10 и -12) и эффекторные (каспаза-3, -6 и -7). Отличительной чертой иницирующих каспаз является наличие сложно организованного продомена, на котором располагаются сайты, отвечающие за распознавание и взаимодействие

с регуляторными белками, следствием такого взаимодействия является активация эффекторных прокаспаз [57]. Так, в случае рецептор-зависимого пути запуска апоптоза ключевая роль отводится активации инициирующей каспазы-8, в составе продомена которой имеются повторы DED для взаимодействия с белком FADD. При митохондриальном сигнальном пути индукции апоптоза ключевое место отводится каспазе-9, в составе которой находится домен CARD, отвечающий за связывание с аналогичным доменом белка APAF-1, что, в конечном итоге, приводит к формированию апоптосомы. Следует отметить, что оба эти пути направлены на активацию каспазы-3 — одной из основных эффекторных каспаз [24]. К основным мишеням последних относятся белки и ферменты, отвечающие за фрагментацию ДНК (каспазазависимые эндонуклеазы, PARP), сохранение целостности ядерной мембраны (ламини А, В и С), целостность цитоскелета клетки (актин, фодрин), передачу внутриклеточных сигналов (некоторые изоформы протеинкиназы С и др.), а также белки-ингибиторы апоптоза (например, антиапоптотические белки семейства bcl-2).

В настоящее время существует два подхода, применяемых в проточной цитофлуориметрии для исследования активности каспаз. Первый основан на применении препаратов моноклональных антител, способных специфически взаимодействовать с активными формами этих ферментов, и требует предварительной пермебиализации клеток. Однако у фирм-производителей можно приобрести антитела только для ключевых модельных объектов, к которым, в первую очередь, относятся млекопитающие. Поэтому в рамках сравнительно-иммунологических исследований наиболее перспективным представляется второй подход, который основан на применении конъюгированных с флуорохромами ингибиторов каспаз. Данные ингибиторы получили в специализированной литературе название FLICA (от англ. *fluorochrome-labeled inhibitors of caspases*). Отличительной особенностью FLICA является низкая токсичность и способность спонтанно диффундировать через мембрану клеток, что позволяет избежать длительной и трудоемкой процедуры пробоподготовки, как это имеет место в случае использования моноклональных антител при исследовании активности каспаз при помощи моноклональных антител [40].

Способность к избирательному взаимодействию соединений типа FLICA с каспазами обусловлена строением молекул [66]. FLICA состоят из трех основных частей: флуорохрома (это либо карбоксифлуоресцеин — FAM, либо

флуоресцеин — FITC, или сульфородамина — SR), сайта из четырех аминокислот для взаимодействия со специфической каспазой, а также хлоро- или сульфометил кетона (СМК или FMK, соответственно). В состав сайта распознавания каспазы может входить последовательность аминокислот, распознаваемая всеми активированными каспазами (VAD — распознает каспазы-1, -3 -4, -5, -7, -8 и -9), что позволяет рассматривать такой субстрат в качестве пан-каспазного маркера. Вместе с тем, для анализа активности конкретных каспаз существуют FLICA, в состав которых входят последовательности, например, тетрапептиды DVAD, DEVD, VEID, YVAD, LETD, LEHD или AEVD, способные специфически взаимодействовать с каспазами-2, -3, -6, -1, -8, -9 или -10, соответственно. После взаимодействия FLICA с остатком цистеина активного центра каспазы формируются комплексы, не способные к диффузии из клетки, тем самым происходит накопление этих ингибиторов каспаз в апоптотических клетках. Так как в составе молекулы FLICA входит флуоресцирующий фрагмент, то это позволяет отличить апоптотизирующие — флуоресцирующие — клетки от живых [53]. Иногда по завершении инкубации образца с FLICA добавляют дополнительные агенты, применяемые для изучения апоптоза и позволяющие повысить информативность исследований, например, аннексин V. Так, применение подобной комбинированной окраски клеток позволило доказать, что активация каскада каспаз предшествует изменению липидного состава цитоплазматической мембраны [53]. Для исследования более поздних стадий апоптоза применяют комбинированную окраску FAM-VAD-FMK и ДНК-связывающими красителями, например, PI, как это приведено на рисунке 2.

В силу своей универсальности аннексин V нашел широкое применение и в сравнительно-иммунологических исследованиях. В настоящее время целый ряд представителей семейства каспаз описан у большинства групп животных, к числу которых относятся кишечнополостные [38], членистоногие [12], моллюски [71] и иглокожие [55]. Однако из-за отсутствия препаратов антител, конъюгированных с флуорохромами, методы определения каспаз не нашли широкого применения в сравнительно-иммунологических исследованиях у представителей данных групп животных. Так, в литературе встречается единичное упоминание об использовании FAM-VAD-FMK в рамках экспериментов по индукции апоптоза ионами цинка в гемоцитах насекомых *Musca domestica* и *Drosophila melanogaster* [27].

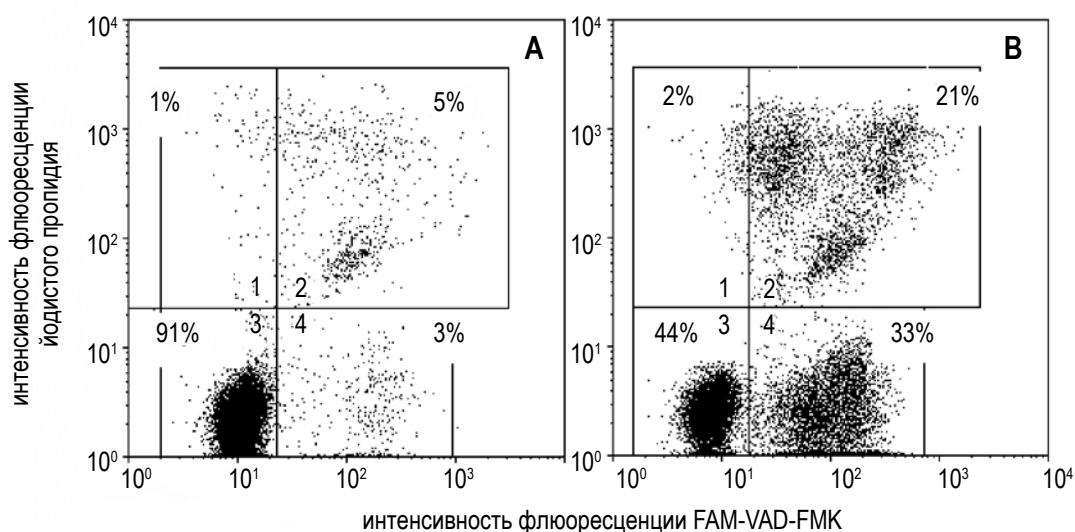


Рисунок 2. Изучение активности каспаз при индукции апоптоза [66]

Примечание. Гистограмма А – контроль, гистограммы В – индукция апоптоза брефельдином А в клетках В-клеточной лимфомы. По оси абсцисс – интенсивность флуоресценции FAM-VAD-FMK, зеленая часть спектра; по оси ординат – интенсивность флуоресценции PI. Область 3 – живые клетки, область 4 – ранний апоптоз (активированные каспазы в цитоплазме, целостность поверхностной мембраны не нарушена), область 2 – поздний апоптоз/некроз (активированные каспазы в цитоплазме, имеет место фрагментация поверхностной мембраны), область 1 – некроз (каспазы не активны, целостность поверхностной мембраны нарушена).

Исследование асимметрии плазматической мембраны клеток при помощи аннексина V, конъюгированного с флуоресцентными красителями

Еще одним универсальным методом исследования апоптоза является анализ липидного состава плазматической мембраны клеток. Как уже отмечалось выше, при запуске апоптоза имеет место изменение распределения различных белков, гликопротеинов и фосфолипидов между наружными и внутренними билипидными слоями клеточной мембраны. В большинстве эукариотических клеток на наружной стороне мембраны преобладают нейтрально заряженные холинсодержащие (фосфатидилхолин и сфингомиелин) фосфолипиды, в то время как для внутренней – обращенной к цитоплазме – стороны мембраны характерно доминирование отрицательно заряженных липидов – фосфатидилэтаноламина, фосфатидилсерина и фосфатидилинозита. Однако такое распределение не является абсолютным – липиды способны спонтанно переходить из одного слоя мембраны в другой, это явление получило название “flip-flopping”. Поддержание ассиметричного расположения липидов является АТФ-зависимым процессом и связано с эффективностью работы липидных транспортеров (транслоказ) – белков семейств флиппаз (перемещение липидов из внешнего слоя мембраны во внутренний) и флоппаз (перенос из внутреннего слоя липидов в наружный). Запуск апоптоза, сопровождающийся снижением концентрации

АТФ внутри клетки, вызывает изменения в работе широкого спектра внутриклеточных ферментов, что и сказывается на нарушении асимметрии клеточной мембраны апоптотирующей клетки [63]. В поверхностном слое мембраны апоптотических клеток в большем, по сравнению с живыми клетками, количестве появляются молекулы фосфатидилсерина. Кроме того, существенную роль в данном процессе может играть фермент под названием скрамблаза, отвечающий за перенос отрицательно заряженных липидов из внутреннего липидного слоя мембраны во внешний. Активация данного фермента может являться следствием повышения концентрации Ca^{2+} на ранних этапах апоптоза. Биологический смысл экстернализации – появления в наружном слое – фосфатидилсерина очень прост и логичен, так как данный липид распознается рецепторами макрофагов, что приводит к быстрому удалению из тканей как клеток, вступивших на путь апоптоза, так и сформировавшихся апоптотических телец при помощи фагоцитоза [18].

В проточной цитофлуориметрии для исследования асимметрии мембраны апоптотирующей клетки, а именно для выявления фосфатидилсерина, используют конъюгаты аннексина V с различными флуорохромами (обычно FITC или PE). Аннексин V, также известный как аннексин А5 или плацентарный антикоагулянтный протеин, является гликопротеином семейства аннексинов с молекулярной массой около 35–36

кДа. В присутствии ионов кальция этот белок способен взаимодействовать с отрицательно заряженными фосфолипидами, при этом он обладает очень высоким сродством к фосфатидилсерину (константа диссоциации около 5×10^{-10} М). Некоторые исследователи считают, что благодаря экранированию аннексином V фосфатидилсерина на поверхности гибнущих клеток и апоптотических телец происходит снижение прокоагулярой и провоспалительной активности последних [7]. Следует отметить, что процессы, связанные с изменением мембранного потенциала митохондрий и активацией каспазы-3, предшествуют появлению фосфатидилсерина во внешнем слое мембраны, а перестройка цитоскелета клетки и нарушение целостности мембраны происходят несколько позднее. Именно поэтому существует множество вариантов комбинирования окраски клеток аннексином V и другими маркерами, направленными на выявления как ранних, так и более поздних фаз апоптоза [67].

В настоящее время наиболее распространенным и широко применяемым методом исследования апоптоза является окрашивание клеток при помощи аннексина V, конъюгированного с FITC, и красителей ДНК (обычно PI или 7-AAD). Эта методика нашла применение в сравнительно-иммунологических исследованиях на весьма широком круге объектов, к числу которых относятся губки [33], различные виды насекомых [27, 45], моллюски [5, 56], колониальные асцидии *Botryllus schlosseri* [11], не говоря уже о представителях позвоночных животных [23].

Принцип этого метода заключается в следующем. В нормальных живых клетках на поверхностной мембране фосфатидилсерин представлен в минимальном количестве, поэтому взаимодействие аннексина V с клетками незначительно. Однако флюоресценция клеток, инкубация которых происходила в отсутствие AnnV-FITC, все равно будет несколько ниже такой живых, но окрашенных AnnV-FITC, клеток. Кроме того, клеточная мембрана, сохраняющая свою целостность, не проницаема для ДНК-связывающих красителей. Следовательно, такие клетки будут негативны как по аннексину-FITC, так и по йодистому пропидию (AnnV-FITC-PI⁻). На ранней стадии апоптоза молекулы фосфатидилсерина появляются на поверхности клеток, что делает их доступными для взаимодействия AnnV-FITC в присутствии двухвалентных катионов кальция (процесс связывания AnnV со своим лигандом, как уже отмечалось, является Ca²⁺-зависимый). Следствием этого взаимодействия является увеличение интенсивности флюорес-

ценции гибнущих клеток по 2, в котором осуществляется детекция флюоресценции FITC. Потеря мембранной асимметрии в динамике развития апоптоза по времени совпадает с запуском конденсации хроматина и фрагментации ДНК.

Однако непроницаемость для ДНК-связывающих красителей клеточной мембраны еще сохраняется, так как ее нарушение имеет место на более поздних стадиях клеточной гибели. Поэтому на гистограммах флюоресценции клетки (как это показано на рисунке 7B), находящиеся на ранних стадиях апоптоза, будут характеризоваться как позитивные по AnnV-FITC и негативные по PI (AnnV-FITC⁺PI⁻). Вместе с тем, клетки, находящиеся на поздней стадии апоптоза или уже погибшие, будут позитивны по обоим маркерам (AnnV-FITC⁺PI⁺). Это происходит в связи с тем, что асимметрия мембран уже нарушена, начиная с ранних стадий апоптоза, а на поздних стадиях апоптоза клеточная и ядерная мембраны становятся проницаемыми для ДНК-связывающих красителей. Такими же характеристиками флюоресценции могут обладать и некротические клетки, поскольку имеют разрушенную мембрану, в результате чего AnnV-FITC и PI свободно проникают в клетки и взаимодействуют со своими лигандами. Кроме того, некротические клетки могут не окраситься AnnV-FITC, за счет разрушения цитоплазматической мембраны, но быть позитивными при окраске PI (AnnV-FITC⁻PI⁺).

Описанный выше метод успешно зарекомендовал себя при работе с суспензионными культурами клеток. Вместе с тем, существенное влияние на качество получаемых результатов может оказывать уровень активации клеток, например, активация и дегрануляция гранулоцитов (нейтрофилы, базофилы), способствующие появлению на поверхности клеток молекул фосфатидилсерина. Существенный вклад в увеличение связывания аннексина V с поверхностью клеток могут внести некоторые технологические особенности стадий подготовки образца, например, применение растворов, содержащих трипсин, или механические воздействия на клетки образца при отделении их от субстрата. Все это может привести к появлению большого числа поврежденных клеток, и, как следствие, будет сопровождаться завышенным числом апоптотических клеток. Отдельного внимания заслуживает настройка напряжения на детекторах для регистрации уровня экспрессии аннексина V. Для настройки следует использовать содержащие апоптотические клетки образцы, окраска которых протекала при условиях полностью аналогичных таковым экс-

периментальных проб (позитивный контроль). Следует избегать применения неокрашенных клеток для настройки данного канала. Это обусловлено тем, что поскольку в любой живой клетке процессы “flip-flopping” идут постоянно, то незначительное число молекул аннексина V будет взаимодействовать с поверхностью живых клеток. Снижение числа апоптотических клеток может быть вызвано отсутствием в среде для постановки реакции двухвалентных катионов кальция, так как взаимодействие аннексина V с фосфотидилсерином является кальций-зависимым процессом. Поэтому в пробы следует добавлять «связывающий буфер» следующего состава: 10 mM HEPES, 140 mM NaCl и 3,3 mM CaCl_2 [5] или 140 mM NaCl, 5 mM CaCl_2 и 10 mM HEPES [23]. Также необходимо помнить, что осмотичность среды для постановки реакции и ее pH должны соответствовать физиологическим значениям для каждого конкретного типа живых организмов. При использовании для постановки реакции коммерческих наборов данный буфер входит в комплект набора «по умолчанию», и его применение рассчитано для постановки реакции с клетками млекопитающих. Описанная выше методика была использована в экспериментах с гемоцитами мидии *Mytilus galloprovincialis* для оценки влияния фактора некроза опухолей α ($\text{TNF}\alpha$) на жизнеспособность клеток [5]. Существенным преимуществом применения аннексина V, конъюгированного с флуорохромами, при изучении апоптоза является возможность комбинировать этого красителя с моноклональными антителами. Так, этот подход был применен для определения уровня апоптоза В-лимфоцитов,

в рамках исследования влияния температурного стресса на эффективность функционирования системы приобретенного иммунитета обыкновенного карпа *Cyprinus carpio* [23]. Результаты одного из экспериментов приведены на рисунке 3.

Изучение функций митохондрий при апоптозе методом проточной цитофлуориметрии

Нарушение функций митохондрий клетки является еще одним универсальным признаком апоптоза, характерным для эукариотических организмов [1]. В результате этого происходит высвобождению в цитоплазму проапоптотических факторов — цитохром с, AIF (apoptosis inducing factor — «фактор индуцирующий апоптоз»), Smac/DIABLO, эндонуклеазы G, а также проформ каспаз 2, 3 и 9 — индуцирующих каскад каспаз [50]. Выход этих белков может реализовываться как за счет разрыва митохондриальных мембран, так и за счет активации специфических каналов во внешней мембране митохондрий. Любое из приведенных выше событий сопровождается изменением проницаемости внутренней мембраны митохондрий для протонов H^+ , что и приводит к изменению мембранного потенциала митохондрий ($\Delta\Psi\text{m}$). Методы изучения мембранного потенциала митохондрий при помощи проточной цитофлуориметрии основаны на применении катионных липофильных красителей, которые в литературе получили название «митохондриальных зондов». Принцип работы этих красителей очень прост — липофильные зонды спонтанно проникают через билипидные мембраны (поверхностную мембрану клетки, а также внешнюю и внутреннюю мембраны митохондрий) и накапливаются в областях с высокой

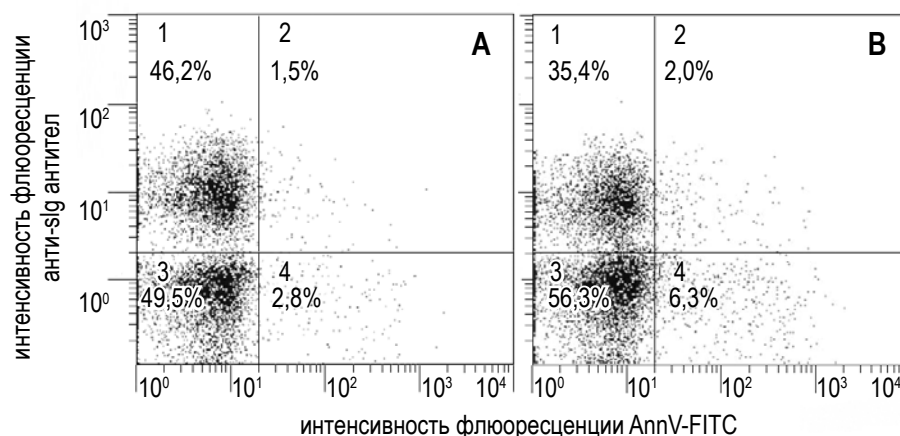


Рисунок 3. Влияние температурного стресса на уровень апоптоза в лимфоцитах обыкновенного карпа *C. carpio* [23]

Примечание. Гистограмма А — образец контрольной группы; гистограмма В — образец экспериментальной группы (4 часа холодового шока). По оси абсцисс — интенсивность флуоресценции AnnV-FITC; по оси ординат — интенсивность флуоресценции WC1 12 антител мыши против Н-целей иммуноглобулина М карпа, выявленных при помощи конъюгированных с PE антител козы против мыши. Область 1 — нормальные В-клетки карпа, область 2 — апоптотизирующие В-клетки; область 3 — нормальные лимфоциты (не В-клетки); область 4 — апоптотизирующий лимфоциты (не В-клетки) карпа.

концентрацией протонов, то есть под внутренней мембраной митохондрий. Этот эффект сопровождается изменением интенсивности флюоресценции клеток, что и регистрируют при анализе на проточном цитофлюориметре. В том случае, если концентрация протонов снижена — снижение $\Delta\Psi_m$ — накопление красителя, и, как следствие, интенсивность его флюоресценции, будут снижены. Тем самым исследователь может отличить интактные клетки с эффективно функционирующими митохондриями (и, как следствие, высокой интенсивностью флюоресценции), от гибнущих или мертвых клеток, в которых функционирование митохондрий нарушено. Как следствие, такие клетки обладают пониженной интенсивностью флюоресценции [13]. Большинство используемых красителей, в зависимости от химической природы, относятся к трем основным группам соединений: родаминовые (родамин 123 (Rh123), этиловый (TMRE) и метиловый (TMRM) эфиры тетраметилродамина), карбоцианиновые (5,5'-6,6'-тетрахлоро-1,1',3,3'-тетраэтилбензамидазолкарбоцианин (JC-1), йодистый 3,3'-диметил- α -нафтоксакарбоцианин (JC-9), йодид 3,3'-дигексилоксакарбоцианина — DiOC₆(3)) и родаминовые красители MitoTracker (см. табл. 1).

К наиболее распространенным красителям, которые применяются для оценки мембранного потенциала митохондрий, относятся DiOC₆(3), Rh123, TMRE и некоторые другие. Чаще всего в литературе можно найти упоминания о DiOC₆(3) и Rh123. Максимумы эмиссии этих красителей находится в зеленой части спектра, а для их возбуждения применяют источник света с длиной волны около 490 нм. При снижении $\Delta\Psi_m$ наблюдается снижение интенсивности флюоресценции этих красителей, что и позволя-

ет отличить живые клетки от клеток, в которых произошел запуск апоптоза.

Родамин 123 (Rh123) был самым первым флюоресцентным красителем, примененным для окрашивания митохондрий живых клеток [34]. Благодаря своим липофильным свойствам Rh123 спонтанно диффундирует через плазматическую мембрану клетки, а наличие катионных свойств помогает ему преимущественно накапливаться в эффективно функционирующих митохондриях, несущих заряд на своей внутренней мембране. Вместе с тем, данный краситель может спонтанно окрашивать компоненты эндоплазматической сети и аппарата Гольджи. Снизить это неспецифическое окрашивание позволяет дополнительная отмывка клеток избытком физиологического раствора по завершении инкубации с красителем. Это связано с тем, что в клетках с нарушенным мембранным потенциалом митохондрий краситель способен с одинаковой скоростью как проникать через мембрану внутрь, так и выходить наружу. Обычно Rh123 применяется в концентрациях не более 0,5 мкМ или 0,1 мкг/мл, так как увеличение концентрации сопровождается усилением неспецифического окрашивания. Для приготовления маточных (стоковых) растворов используют ДМСО, после чего полученный раствор красителя аликвотируют и хранят при -20°C до использования. Рабочие растворы готовят на среде, аналогичной той, что применяют для культивирования клеток. Для исследования апоптоза, как правило, применяют комбинированную окраску родамином 123 (флюоресценция в зеленой области спектра), и йодистым пропидием, максимум эмиссии которого приходится на красную часть спектра. Подобный подход позволяет выделить живые клетки с функционирующими митохондриями по интенсивному свечению Rh123 и целост-

ТАБЛИЦА 1. КРАСИТЕЛИ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА МИТОХОНДРИЙ [13]

Краситель	Максимум возбуждения, нм	Максимум испускания, нм
DiOC ₆ (3)	484	501
Родамин 123	507	529
JC-1	514	529 (мономер) 590 (J-агрегаты)
JC-9	522	535 (мономер) 635 (J-агрегаты)
TMRE	549	574
TMRM	548	573
RedoxSensor Red CC-1	540	600
MitoTracker CMXRos	551	576
MitoFluor Red 584	604	637

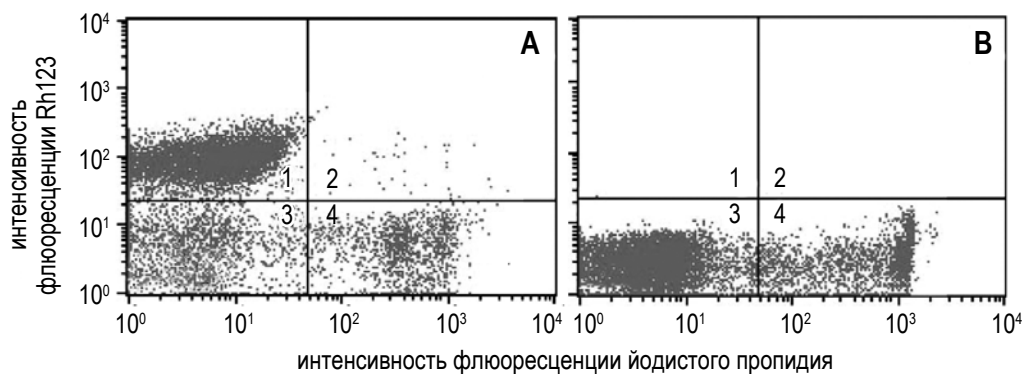


Рисунок 4. Влияние ультрафиолетового излучения на жизнеспособность сперматозоидов морского ежа *A. crassispina* [44]

Примечание. Гистограмма А – контроль, гистограмма В – сперматозоиды, подвергнутые ультрафиолетовому облучению мощностью 27 кДжм^{-2} на протяжении получаса. По оси абсцисс – интенсивность флюоресценции PI, по оси ординат – интенсивность флюоресценции родамина 123. Область 1 – живые клетки, область 3 – ранний апоптоз клеток, область 4 – поздний апоптоз/некроз клеток.

ной поверхностной мембраной, непроницаемой для PI. Клетки, находящиеся на ранних стадиях апоптоза, будут негативны по обоим красителям (мембранный потенциал митохондрий нарушен, но поверхностная мембрана еще сохраняет свою целостность), а при позднем апоптозе и некрозе клетки будут окрашиваться только PI. Широкое применение этот метод находит и в работах на низших позвоночных и беспозвоночных животных – морских ежах *Anthocardaris crassispina* [44], представителях двусторчатых и брюхоногих моллюсков [2], а также костных рыбах *Oncorhynchus mykiss* [4]. Примером подобного рода исследования может служить работа Lu и Wu (2005), посвященная изучению влияния ультрафиолетового излучения на жизнеспособность сперматозоидов морского ежа *A. crassispina* [44]. Результаты анализа контрольной и экспериментальной проб приведены на рисунке 4.

Особенностью DiOC₆(3) является и то, что для исследования функций митохондрий его следует применять в низких, по сравнению с Rh123, концентрациях (10–20 нМ), так как в концентрациях свыше 50 нМ он спонтанно связывается с мембранами клеток и компонентами эндоплазматической сети. Кроме того, его лучше использовать для исследования гомогенных клеточных популяций, так как на интенсивность окраски митохондрий влияет как соотношение клетки/краситель, так и физиологическое состояние клеток и т.п. Данный краситель был использован для работ на циркулирующих гемоцитах устрицы *Ostrea edulis* [54]. При постановке экспериментов DiOC₆(3) вносили к суспензии гемоцитов в финальной концентрации 2 мкМ, и после 5 минутной инкубации проводили анализ в проточном цитофлуориметре.

С использованием данного красителя авторам удалось выделить три популяции гемоцитов моллюска (рис. 5). Малые гиалиноциты, характеризовались низким значением флюоресценции красителя DiOC₆(3) и низкими значениями параметров прямого и бокового светорассеяния (область R1 на гистограмме А). Большие гиалиноциты, имевшие промежуточные значения

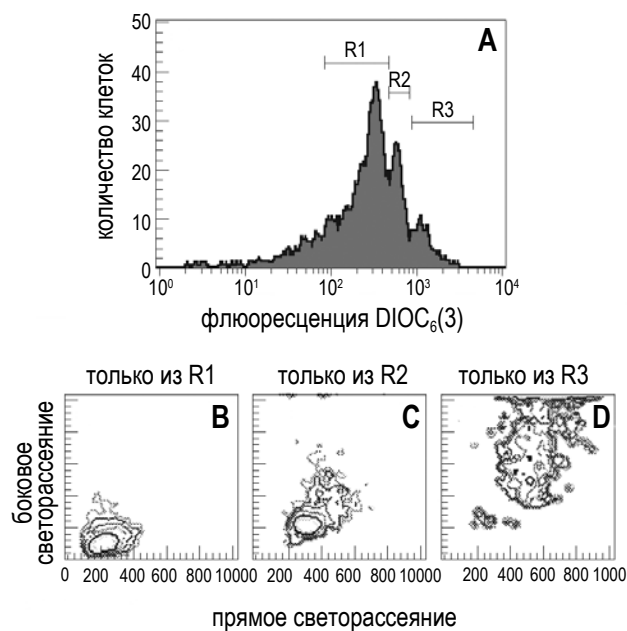


Рисунок 5. Исследование мембранного потенциала митохондрий гемоцитов устрицы *O. edulis* [54]

Примечание. Гистограмма А: по оси абсцисс – интенсивность флюоресценции DiOC₆(3); по оси ординат – количество клеток. R1, R2 и R3 – популяции клеток, обладающие различной интенсивностью флюоресценции по DiOC₆(3). Гистограммы В, С и D: по оси абсцисс – малоугловое светорассеяние; по оси ординат – боковое светорассеяние. На гистограммах отображены клетки, обладающие различной флюоресценцией по DiOC₆(3), которые находятся в областях R1, R2 и R3 гистограммы А соответственно.

по перечисленным выше параметрам (область R2 на гистограмме А). В состав третьей популяции входили гранулоциты с высокой интенсивностью флюоресценции DiOC₆(3) и характеризовавшиеся крупными размерами и сложной структурой цитоплазмы по сравнению с остальными популяциями гемоцитов (область R3 на гистограмме А). Полученные при помощи проточной цитофлюориметрии результаты о соотношении клеточных популяций в гемолимфе устриц соответствовали данным литературы, где для этих целей были применены методы световой микроскопии. Вместе с тем, авторы сделали вывод о том, что митохондрии гранулярных клеток обладают большим по сравнению с остальными клетками мембранным потенциалом, что могло быть связано с избытком красителя DiOC₆(3), использованного для окраски митохондрий.

Еще одним флюорохромом, применяемым для исследования $\Delta\Psi_m$, является краситель JC-1, для возбуждения которого также используется лазер с длиной волны около 490 нм. Благодаря своим липофильным свойствам мономеры этого красителя способны спонтанно проникать че-

рез мембрану в цитоплазму клеток. Так как JC-1 является катионным красителем, то его концентрация будет максимальной в местах с повышенным содержанием протонов, следовательно, эти мономеры будут устремляться в митохондрии, где в пространстве под внутренней мембраной концентрация протонов будет максимальной. В состоянии мономера JC-1 обладает максимумом эмиссии в зеленой части спектра. Однако при высоких концентрациях красителя, формирующихся в эффективно функционирующих митохондриях (-140 mV), мономеры способны формировать агрегаты, получившие название «J-агрегатов». Формирование J-агрегатов сопровождается смещением эмиссии в красную часть спектра с максимумом около 590 нм. Однако при деполяризации митохондриальной мембраны – снижении $\Delta\Psi_m$, что рассматривается в качестве раннего признака апоптоза, JC-1 в меньшей степени накапливается внутри митохондрии и остается в цитоплазме в виде мономерной формы. Следовательно, при анализе с использованием проточного цитофлюориметра в апототизирующих клетках максимум эмиссии JC-1 будет сме-

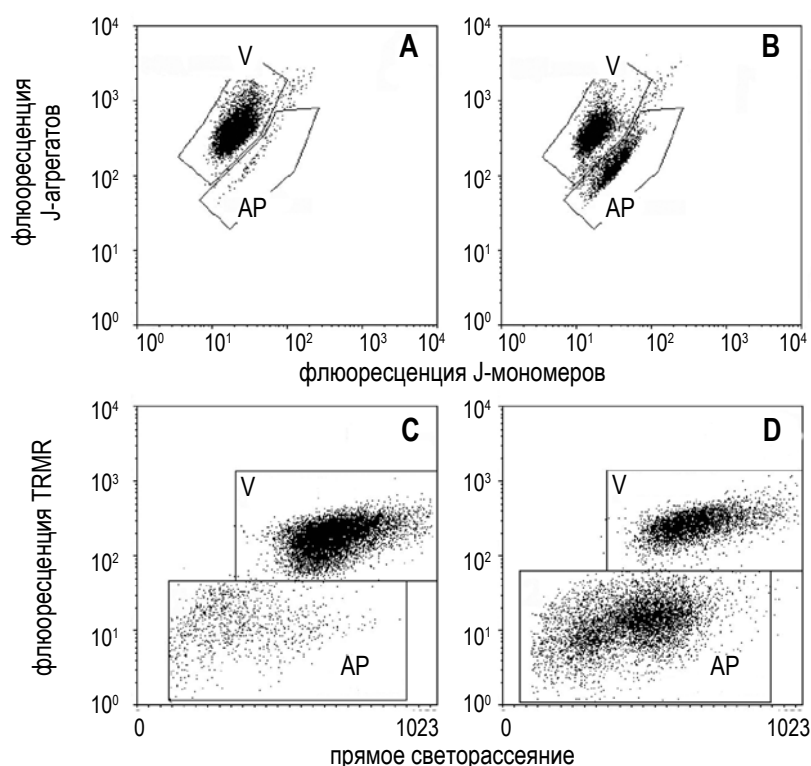


Рисунок 6. Исследование мембранного потенциала митохондрий при помощи красителей JC-9 и TMRM в клетках В-клеточной лимфомы человека [66, 67]

Примечание. Гистограммы А и В: по оси абсцисс – интенсивность флюоресценции J-мономеров; по оси ординат – интенсивность флюоресценции J-агрегатов. Гистограмма А – контрольная проба; гистограмма В – индукция апоптоза при помощи анти-CD95 антител. Гистограммы С и D: по оси абсцисс – прямое светорассеяние, по оси ординат – интенсивность флюоресценции TMRM. Гистограмма А – контрольная проба, гистограмма В – индукция апоптоза при помощи циклогексимида. Область 1 – живые клетки с нормально функционирующими митохондриями; область 2 – клетки со сниженным мембранным потенциалом митохондрий.

ТАБЛИЦА 2. КРАСИТЕЛИ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ МИТОХОНДРИЙ [13]

Краситель	Максимум возбуждения, нм	Максимум испускания, нм	Лиганды
MitoTracker Green MT	490	516	Свободные тиольные группы остатков цистеина
MitoFluor Green	489	517	аналогично
Nonyl Actidine Orange	495	519	кардиолипид
MitoFluor Red 589	588	622	неизвестно
MitoTracker Red 580	581	644	Хлорометильные группы аминокислотных остатков
MitoTracker Deep Red 633	644	665	
Mito-ID Red	558	690	кардиолипид

шаться от красной области спектра к его зеленой части, как это показано на рисунке 6. Именно это свойство красителя было использовано при исследовании способности фомезафена, применяемого в качестве гербицида, вызывать апоптоз гемоцитов брюхоногого моллюска *Lymnaea stagnalis* [58].

Отдельного внимания заслуживают липофильные родаминовые соединения TMRE и TMRM. Они способны спонтанно проникать через поверхностную мембрану клеток и специфически накапливаться в поляризованных мембранах митохондрий, а не других органеллах клетки. При деполяризации митохондриальной мембраны этот процесс нарушается, и, как следствие, имеет место снижение флуоресценции, что и позволяет отличить погибшие клетки от живых. Поэтому при настройке прибора в качестве контроля необходимо использовать образцы, содержащие нормальные живые клетки, что позволяет быстро оценить уровень флуоресценции живых клеток и корректно установить зоны анализа. Существенным преимуществом этих красителей является то, что анализ образцов на проточном цитофлуориметре можно проводить сразу после их добавления к клеткам без дальнейших манипуляций. На рисунке 6 приведен пример использования TMRM для определения апоптоза. Кроме того, показано, что параллельно со снижением мембранного потенциала митохондрий происходит изменение морфологических параметров исследуемых клеток (в данном случае — снижение интенсивности прямого светорассеяния, характеризующего размер исследуемых клеток). Краситель TMRM в финальной концентрации 40 нМ был применен для изучения влияния наночастиц углерода на жизнеспособность гемоцитов двусторчатого моллюска *M. galloprovincialis* [8]. Было показано, что частицы в максимальной концентрации 10 мкг/мл вызывали снижение мембранного потенциала митохондрий гемоцитов, что трактовалось авторами как проявления

токсического эффекта препарата. Для подтверждения полученных результатов авторы применяли еще и методику оценки общего количества митохондрий в гемоцитах с использованием красителя MitoTrackerGreen FM-MT. В этом случае инкубация гемоцитов осуществлялась в присутствии данного красителя в финальной концентрации 50 нМ в течение 30 минут при физиологических условиях. Показано, что внесение частиц в концентрациях 10 мкг/мл также, как и в случае применения TMRM, сопровождалось снижением интенсивности флуоресценции красителя, что рассматривалось в качестве снижения массы митохондрий в гемоцитах. Следует отметить, что краситель MitoTrackerGreen MT относится к группе митохондриальных красителей, флуоресценция которого не зависит от мембранного потенциала митохондрий. Основные красители, составляющие эту группу, приведены в таблице 2.

В проточной цитофлуориметрии, как и в флуоресцентной микроскопии, эта группа красителей применяется для выявления митохондрий в клетках, при этом флуоресценция клеток строго пропорциональна содержанию в них этих органелл или их массе, что обусловлено способностью красителей взаимодействовать со специфическими структурами митохондрий. Например, Mito-ID Red и нонил акридиновый оранжевый специфически взаимодействуют с липидами внутренней мембраны митохондрий, а именно с кардиолипином. MitoTracker Green в виде нефлуоресцирующего соединения проникает через поверхностную мембрану и избирательно накапливается в митохондриях. После проникновения под внутреннюю мембрану митохондрий этот краситель способен выборочно взаимодействовать с остатками цистеина в составе митохондриальных белков, в результате чего переходит во флуоресцирующую форму с максимумом эмиссии в зеленой области спектра. Аналогичным свойством обладают и остальные красители группы MitoTracker, интенсив-

ность флюоресценции которых также не зависит от мембранного потенциала митохондрий. Следует отметить, что применение красителей, обладающих флюоресценцией в красной части спектра (MitoTracker Red и Deep Red), позволяет их комбинировать с другими флюоресцентными зондами. Так, например, комбинация кальциевых и ДНК-«зондов» с рН-чувствительными красителями, позволяет существенно повысить информативность научных исследований [26].

Комбинированная окраска клеток витальными красителями и ДНК-флюорохромами для исследования жизнеспособности и апоптоза

Одним из следствий запуска апоптоза в клетке является снижение активности внутриклеточных ферментов. Поэтому существует целый набор методов проточной цитофлюориметрии, основанных на использовании флюоресцентных субстратов для определения активности цитоплазматических белков. В первую очередь это относится к внутриклеточным эстеразам — ферментам класса гидролаз. Эти ферменты отвечают за гидролитическое расщепление сложных эфиров на спирты и кислоты при участии молекул воды. Поэтому красители, применяемые для этих методик, являются эфирами, что позволяет им не только подвергаться действию эстераз, но и, проявляя липофильные свойства, спонтанно проникать в клетки из культуральной среды. Потеря гидроксильных групп после взаимодействия с ферментами сопровождается не только накоплением красителя в клетке, но и способствует появлению флюоресценции в ответ на облучение источником света с определенной длиной волны. Принципиальным отличием этой группы красителей от других флюорохромов, применяемых для исследования жизнеспособности клеток (ДНК-флюорохромов), является то, что

они проникают исключительно в живые клетки. При анализе на проточном цитофлюориметре апоптотические и разрушенные клетки не будут окрашиваться и, как следствие, испускать флюоресценцию. Большая часть флюоресцентных красителей хорошо растворима в ДМСО, применяемом для приготовления стоковых растворов (концентрации в пределах 1–10 мМ). Непосредственно перед постановкой эксперимента стоковый раствор добавляют к культуральной среде, применяемой для постановки реакции, получая финальные концентрации в диапазоне 1–25 мкМ. В настоящее время набор этих красителей весьма разнообразен, что позволяет эффективно их использовать совместно с другими флюоресцентными маркерами (флюорохром-меченые моноклональные антитела, ДНК-флюорохромов и т.д.) в рамках различного рода исследований. В таблице 3 приведены основные красители, применяемые для исследования активности внутриклеточных эстераз.

Примером может служить работа по изучению влияния живых и термоинактивированных *Bonamia ostreae* (высокоспециализированных внутриклеточный паразит устриц) на жизнеспособность гемоцитов устрицы *Ostrea edulis* [48]. Однако чаще всего эти красители используются совместно с ДНК-связывающими флюорохромами. Так, альтернативой методике исследования апоптоза с применением аннексина V и PI, может служить метод, основанный на одновременной окраске клеток диацетатом флюоресцеина (FDA) и PI. FDA, находящийся в форме диэфира, не обладает способностью испускать флюоресценцию, но, благодаря липофильным свойствам, способен спонтанно диффундировать через клеточную мембрану. В цитозоле клеток FDA подвергается воздействию неспецифических эстераз, кото-

ТАБЛИЦА 3. ФЛЮОРЕСЦЕНТНЫЕ КРАСИТЕЛИ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ЭСТЕРАЗ [48, 60, 67]

Краситель	Длина волны возбуждения, нм	Длина волны испускания, нм
Кальцеин АМ	495	515
Фиолетовый кальцеин АМ	408	450
Голубой кальцеин АМ	360	445
Красно-оранжевый кальцеин АМ	576	589
ВСЕСФ АМ	490	535
Флюоресцеин диацетат (FDA)	494	518
Карбоксифлюоресцеин диацетат (CFDA)	~490	535
CellTracker Green CMFDA	492	517
Карбоксинафтофлюоресцеин диацетат	598	668

рые отщепляют от него гидроксильные группы. Следует отметить, что данный тип ферментов характерен для всех эукариотических клеток, что и позволяет применять FDA на широком круге биологических объектов. Продуктом гидролиза FDA является отрицательно заряженный флюоресцеин не способный спонтанно диффундировать из клетки, но обладающий выраженной флюоресценцией в зеленой части спектра. Таким образом, живые клетки, обладающие эффективно работающим ферментативным аппаратом, способны, во-первых, к гидролизу FDA и, во-вторых, к его удержанию в цитозоле. Это обусловлено тем, что на внутренней поверхности цитоплазматической мембраны представлены отрицательно заряженные фосфолипиды, препятствующие выходу отрицательно заряженного флюоресцеина наружу. У клеток, вступивших в апоптоз или уже находящихся на его поздних стадиях, нарушаются как процессы гидролиза, так и целостность клеточной мембраны. Следовательно, регистрируя флюоресценцию в зеленой области спектра, можно отличить живые клетки с эффективно функционирующим ферментативным аппаратом и неповрежденной мембраной (и, как следствие, обладающих выраженной флюоресценцией) от гибнущих или мертвых клеток, флюоресценция которых будет снижена или вообще отсутствует. При одновременном окрашивании клеток FDA и ДНК-связывающими красителями (PI или 7-AAD) на гистограммах распределения флюоресценции можно выделить несколько популяций клеток, отличающихся

по интенсивности флюоресценции в разных областях спектра (рис. 7, гистограмма А). Как уже отмечалось выше, PI и 7-AAD не способны проникать через поверхностную мембрану, их появление в клетках может быть обусловлено только нарушением целостности мембраны. Следовательно, живые клетки будут позитивны по FDA и негативны по PI, а клетки, находящиеся на ранних стадиях апоптоза, когда работа внутриклеточных ферментов нарушена, но поверхностная мембрана еще сохраняет свою целостность, не будут окрашиваться по обоим красителям. Тогда как погибшие клетки с нарушенной цитоплазматической мембраной будут негативны по FDA, но будут окрашены PI. В сравнительно-иммунологических исследованиях данный метод чаще всего применяется для изучения процессов апоптоза у представителей костных рыб: обыкновенного карпа *C. carpio* [60, 61], королевской дорады *Sparus aurata* [62] и глазчатой рыбы-собаки *Takifugu rubripes* [59]. Впервые для низших позвоночных животных этот метод был применен Saha и соавторами для оценки способности различных стероидных гормонов запускать апоптоз в лейкоцитах карпа [60]. На рисунке 7 приведены гистограммы, полученные с использованием данного метода (А), а в качестве референсного метода оценки уровня апоптоза в лимфоцитах приведены данные, полученные при комбинированной окраске клеток AnnV-FITC и PI (гистограмма В).

По результатам проведенных исследований была обнаружена высокая корреляция между результатами, полученными с использованием ком-

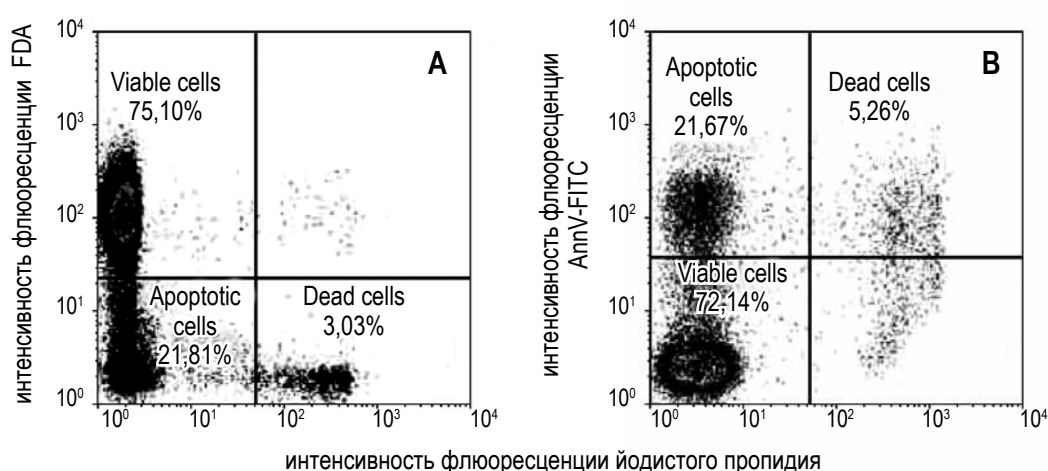


Рисунок 7. Изучение проапоптогенной активности стероидных гормонов в отношении лейкоцитов карпа *C. carpio* [60]

Примечание. Гистограмма А: по оси абсцисс – интенсивность флюоресценции PI, по оси ординат – интенсивность флюоресценции FDA. Живые клетки – FDA⁺PI⁻, клетки на ранних стадиях апоптоза – негативны по обоим флюоресцентным красителям. Апоптотические/некротизированные клетки – FDA⁺PI⁺. Гистограмма В: по оси абсцисс – интенсивность флюоресценции PI, по оси ординат – интенсивность флюоресценции аннексина V, конъюгированного с FITC. Живые клетки – негативны по обоим маркерам, клетки на ранних стадиях апоптоза – AnnV-FITC⁺PI⁻. Апоптотические/некротизированные клетки – позитивны по обоим флюоресцентным красителям.

бинации флуоресцентных красителей FDA-PI и коммерческим набором на основе AnnV-FITC и PI. Сравнение гистограмм по одному из наблюдений приведено на рисунке 7. Кроме того, было показано, что из всех стероидных гормонов, применявшихся в ходе экспериментов, только кортизол обладал выраженным проапоптотическим эффектом, причем данный эффект носил выраженный дозозависимый характер (по мере увеличения концентраций с 1 до 100 нг/мл число клеток, вступающих в апоптоз, достоверно возрастало).

Отдельного рассмотрения заслуживают работы, посвященные оценке жизнеспособности сперматозоидов различных видов животных при помощи комбинированной окраски ДНК-красителями — SYBR-14 и PI. Принцип определения апоптотических клеток основан на способности красителя SYBR-14 проникать через неповрежденную мембрану клеток и взаимодействовать с ДНК. В результате такого взаимодействия SYBR-14 при облучении источником света с длиной волны 488 нм испускает флуоресценцию в зеленой части спектра, что и позволяет идентифицировать нормальные не поврежденные клетки.

Ранние этапы нарушения целостности плазматической мембраны сопровождается проникновением в клетки PI, в результате чего они окрашиваются обоими красителями, причем интенсивность флуоресценции SYBR-14 снижается. В то время как клетки с полностью нарушенной мембраной окрашиваются только PI. Для окраски клеток используют концентрации SYBR-14 в пределах 20–60 нМ. Маточный раствор готовят из раствора SYBR-14 в ДМСО, после чего аликвотируют и хранят при -20°C , при этом

раствор остается стабильным не менее года. Этот метод успешно зарекомендовал себя не только при работе со сперматозоидами млекопитающих [30, 31, 46], но и с аналогами этих клеток у широкого круга морских беспозвоночных — моллюсков *Crassostrea virginica* и *Dreissena polymorpha*, морских ежей *Lytechinus variegatus* и т.д. [25, 52], примеры приведены на рисунке 8.

Исследование процессов фрагментации ДНК в апоптотической клетке при помощи проточной цитофлуориметрии

Фрагментация ДНК является одним из характерных признаков апоптоза, который наиболее часто используется в проточной цитофлуориметрии для выявления популяции клеток, вступивших в апоптоз. Процесс деградации ДНК рассматривают как один из отличительных признаков апоптоза и выделяют несколько стадий. Первоначально происходит образование крупных фрагментов, содержащих 0,05–1 млн оснований. На следующем этапе формируются более мелкие фрагменты, содержащие около 300 тыс. пар оснований. В дальнейшем процесс фрагментации продолжается, и образуются фрагменты, состоящие в среднем из 30–50 тыс. пар оснований. Все это является следствием активации каскада каспаз (каспазы-3, -6 и -7), который приводит к появлению низкомолекулярных фрагментов ДНК [24]. Первый механизм связан с нарушением способности ДНК к репарации за счет инактивации каспазой-3 фермента поли (АДФ-рибозо) полимеразы — PARP-топоизомеразы, отвечающей за репарацию ДНК. Второй механизм связан с активацией ДНКаз. Каспазы (в первую очередь, каспаза-3) способны вызывать диссоциацию комплекса CAD-ICAD, в состав которого входят эндонуклеаза CAD (caspase-activated

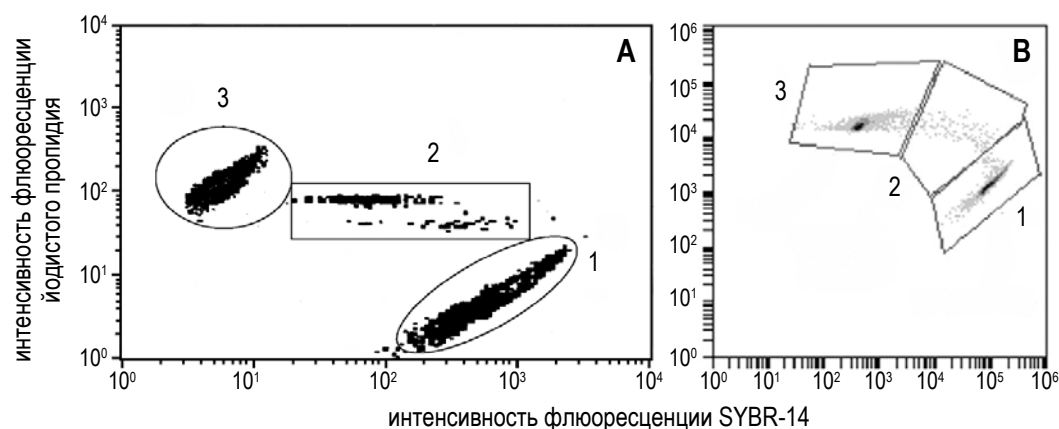


Рисунок 8. Применение комбинированной окраски SYBR-14 и PI для определения жизнеспособности сперматозоидов устрицы *C. virginica* (гистограмма А [52]; гистограмма В [25])

Примечание. По оси абсцисс — интенсивность флуоресценции SYBR-14, по оси ординат — интенсивность флуоресценции PI. Область 1 — живые клетки; область 2 — клетки с поврежденной плазматической мембраной; область 3 — погибшие клетки.

deoxyribonuclease — каспазо-активируемая дезоксирибонуклеаза) и ICAD, являющийся ингибитором CAD. В норме этот комплекс локализуется в цитоплазме, и участки, отвечающие за ядерную локализацию и эндонуклеазную активность CAD, в нем инактивированы. После взаимодействия с каспазами происходит активация CAD, что сопровождается транслокацией этого фермента в ядро, где и проявляется его эндонуклеазная активность. Еще одним субстратом каспаз является гистон H1, блокирующий посадку эндонуклеаз на фрагменты ДНК между отдельными нуклеосомами. Помимо CAD, наиболее исследованной к настоящему времени эндонуклеазы, в процессах деградации ДНК задействованы ДНКаза-I, -II и -X, роль которых при апоптозе еще до конца не исследована. После чего начинается «межнуклеосомная деградация» ДНК с формированием участков, содержащих в среднем 180 пар оснований или кратных им по протяженности, что равняется длине нити ДНК в одной или нескольких нуклеосомах, соответственно [22, 37]. Одним из подходов для исследования апоптоза в клетках при помощи проточной цитофлуориметрии является выявление подобных разрывов в ДНК. Наиболее распространенная методика, применяемая для этих целей, в специализированной литературе получила название TUNEL (от англ. TDT-mediated dUTP nick-end labeling).

Параллельно идет процесс конденсации хроматина, и нарушается целостность ядерной оболочки и поверхностной мембраны клеток. На этой особенности апоптотических клеток основаны методы, позволяющие сравнить относительный набор ДНК в нормальных и гибнущих клетках. Для этого клетки подвергают дополнительной обработке, способствующей потере

низкомолекулярных фрагментов ДНК, а после окраски ДНК-связывающими и проточной цитофлуориметрии выявляют «гиподиплоидный» набор ДНК, то есть меньший по сравнению с нормальными клетками. Этот метод основан на способности малых фрагментов ДНК (до 200 пар оснований) покидать клетки, целостность мембраны которых нарушена при помощи, например, тритона X-100 или сапонина, либо после использования преципитирующих фиксаторов (спирты или ацетон). При этом более крупные фрагменты ДНК гибнущих клеток не способны проникать через образовавшиеся разрывы плазматической мембраны. Однако потеря низкомолекулярных фрагментов ДНК при окраске флуорохромами оказывается достаточной для того, чтобы отличить нормальные клетки от апоптотических.

Итак, все подходы, направленные на выявление разрывов в ДНК, базируются на двух универсальных принципах [42]. Во-первых, при фрагментации ДНК образуются разрывы между отдельными нуклеотидами, что сопровождается высвобождением их 3'-ОН групп, которые, в свою очередь, могут быть выявлены при помощи присоединения к ним нуклеотидов. Во-вторых, эти встроенные нуклеотиды в дальнейшем могут быть выявлены при помощи флуоресцентных меток, которые определяются при помощи проточной цитофлуориметрии. Так, для достройки нуклеотидов при разрыве одной из цепей ДНК используют фермент ДНК-полимеразу (технология ISN, от англ. in situ nick), а для присоединения модифицированных нуклеотидов при разрыве обеих цепей ДНК — терминальную дезоксирибонуклеотидил трансферазу (TdT), применяемую при постановке TUNEL. Следует отметить, что



Рисунок 9. Выявление двуцепочечных разрывов в ДНК апоптотизирующих клетках при помощи проточной цитофлуориметрии [15, 42]

Примечание. По оси абсцисс — интенсивность флуоресценции PI; по оси ординат — интенсивность флуоресценции различных «зондов» (комментарии в тексте). Цифрами указано соотношение средних интенсивностей флуоресценции популяций апоптотических и живых клеток. Клетки, находящиеся вне первой декады логарифмической шкалы флуоресценции, считаются вступившими в апоптоз, а клетки, лежащие в первой декаде, считаются живыми.

эти модифицированные нуклеотиды могут быть конъюгированы с флюорохромами, при этом будет регистрироваться их собственная флюоресценция (прямой метод оценки). Однако наиболее широкое применение нашли не прямые методы оценки встраивания нуклеотидов, основанные на их выявлении при помощи меченых флюорохромами моноклональных антител, показавшие более высокую чувствительность и специфичность. Среди нуклеотидов, применяемых в рамках различных модификаций данной методики, наиболее широкое распространение получил бромдезоксисуридин — BrdU [42]. Это связано с его низкой стоимостью, простотой в использовании, высокой специфичностью связывания, относительной дешевизной антител, используемых для его детекции, а также высокой чувствительностью, как это показано на гистограмме А рисунка 9. В качестве сравнения использованы методы, основанные на использовании конъюгированного с BODIPY и FITC дезоксиуридинтрифосфата (гистограммы D и E, соответственно). А среди методов не прямой оценки сравнивали биотинилированный дезоксиуридинтрифосфат, выявляемый при помощи авидина, меченного FITC, и дезоксиуридинтрифосфат, конъюгированный с дигоксигенином, для выявления последнего применяли препараты моноклональных антител, связанных с FITC (гистограммы С и В, соответственно). Таким образом, интенсивность флюоресценции апоптотических клеток, включивших BrdU, который был выявлен при помощи FITC-конъюгированных моноклональных антител, превышает таковую живых клеток почти в восемь раз.

Итак, из всех методов исследования апоптоза, основанных на выявлении разрывов в ДНК,

наиболее распространенным является TUNEL. Ключевую роль при постановке реакции отводят фиксации клеток «сшивающими» агентами, в качестве которых чаще всего используют растворы параформальдегида. Данная стадия необходима для того, чтобы низкомолекулярные фрагменты ДНК не «вымывались» из клеток, как это имеет место при фиксации спиртами. По завершении фиксации клетки необходимо пермебиализировать для того, чтобы обеспечить доступ ферментов и, в дальнейшем, моноклональных антител к ДНК. Для этого обычно применяют спирты — охлажденный до 0 °С 70% этанол, в этом случае проба может храниться длительное время при -20 °С до постановки реакции [32]. Однако можно использовать и любые другие пермебиализирующие агенты — тритон X-100, Tween 20, сапонин и т.д. По завершении пермебиализации суспензию клеток отмывают избытком изотонического раствора и ресуспендируют в «реакционном буфере». В состав данного буфера (обычно его готовят 5-кратным) входят следующие компоненты: 1М какодита натрия или калия, 125 мМ Tris-HCl (для поддержания pH равного 6,6) и 0,125% бычьего сывороточного альбумина. Для постановки реакции в качестве источника нуклеотидов для TdT используют 5-бромо-2'-дезоксисуридин-5'-трифосфат (BrdUTP), маточный (стоковый) раствор — 2 мМ BrdUTP в 50 мМ Tris-HCl с pH 7,5. Кроме того, также необходим 10 мМ раствор хлорида кобальта и фермент TdT (обычно 25 МЕ/1 мкл). Более детальный протокол, как и основные рекомендации по подготовке образцов и приготовлению реакционных смесей можно найти в [15]. По завершении инкубации (протекавшей при 37 °С) для выявления встроенного в ДНК BrdU вносят конъюгированные

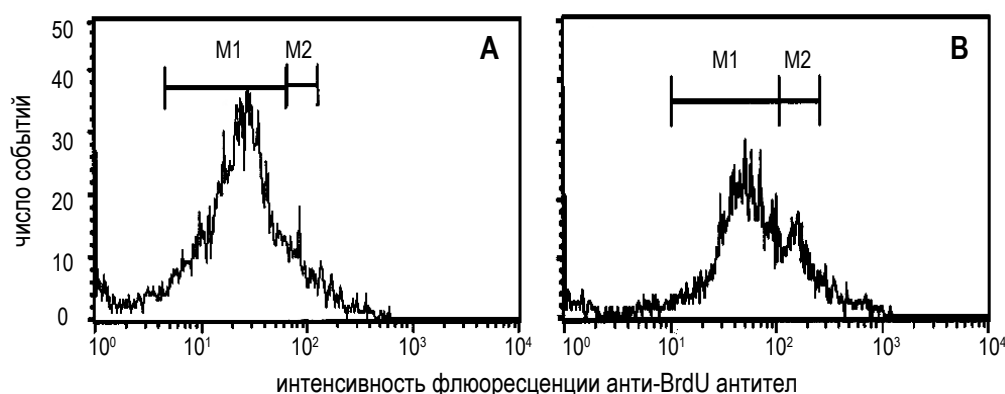


Рисунок 10. Оценка уровня апоптоза в циркулирующих гемоцитах асцидии *C. intestinalis* контрольной (гистограмма А) и экспериментальной (гистограмма В, инъекция бактерий *E. coli*) группах через 6 часов после начала эксперимента [43]

Примечание. По оси абсцисс — интенсивность флюоресценции анти-BrdU антител; по оси ординат — число событий. Область M1 — живые клетки, область M2 — апоптотические клетки.

с флюорохромами моноклональные антитела, специфически связывающие BrdU. Кроме того, по завершении инкубации с антителами образцы дополнительно окрашивают PI, что позволяет сопоставить TUNEL-метод с относительным содержанием ДНК в клетке, как это показано на гистограмме А рисунка 9. При постановке реакции следует использовать контрольные пробы, в числе которых должны находиться образцы негативного (инкубация в отсутствие TdT) и позитивного (вместо TdT используется ДНК-полимераза) контролей, что гарантирует корректность получаемых результатов.

В сравнительно-иммунологических исследованиях чаще всего данная методика используется в модификации, предназначенной для оценки результатов при помощи микроскопии. Применение проточной цитофлуориметрии для оценки уровня апоптоза при помощи TUNEL встречается в работах по насекомым [68] и асцидиям [43]. В последней работе методика постановки реакции описана более подробно. В ходе данной серии экспериментов *in vivo* асцидиям *C. intestinalis* вводили суспензию бактерий *E. coli*, контролем служило введение равного объема модифицированного физиологического раствора. На различных сроках после начала эксперимента у животных контрольной и опытной групп проводили забор гемолимфы с циркулирующими гемоцитами и определяли число апоптотических гемоцитов (рис. 10). При расстановке областей негативных (область М1) и позитивных (область М2) клеток использовали образцы негативного контроля.

В ходе проведенных исследований было показано, что в циркулирующей гемолимфе асцидий уже через три часа после начала эксперимента

появлялись клетки, несущие признаки апоптоза (популяция TUNEL-позитивных гемоцитов) как по данным проточной цитофлуориметрии, так и флюоресцентной микроскопии. В контрольных группах число TUNEL-позитивных гемоцитов достоверно не изменялось на протяжении всего срока наблюдений. Таким образом, данная методика может успешно применяться как в экспериментах *in vitro*, так и *in vivo* при работе с клетками различных представителей животных.

Следует отметить, что методы, направленные на выявление разрывов в ДНК, являются весьма трудоемкими и требуют наличия определенных навыков лабораторной работы и предполагают использование дорогостоящих реактивов. Поэтому наиболее широкое применение в сравнительно-иммунологических исследованиях находят подходы, основанные на выявлении клеток, несущих гиподиплоидный набор ДНК. При подготовке образцов для последующего анализа на проточном цитофлуориметре применяют не «сшивающие», как это было в случае TUNEL, а преципитирующие фиксирующие растворы на основе спиртов или ацетона. Кроме того, часто применяются различного рода детергенты, например, тритон X-100 или сапонин. Эти агенты особенно эффективны в составе гипотонических растворов и в сочетании с цитратным буфером, увеличивающими вымывание из клеток низкомолекулярных фрагментов ДНК. Подобная подготовка образца не приводит к потере крупных фрагментов ДНК, но потеря низкомолекулярных фрагментов при последующей окраске ДНК-флюорохромами оказывается достаточной для того, чтобы отличить нормальные клетки от апоптотических или «гипохромных» клеток,

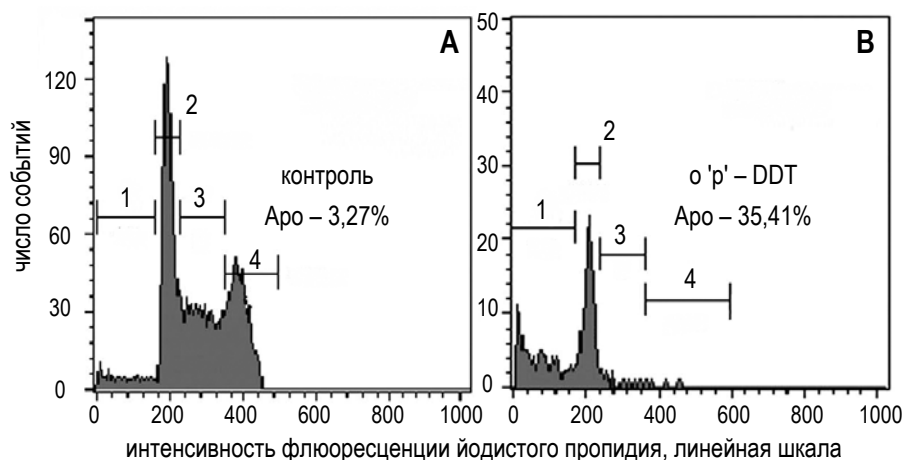


Рисунок 11. Индукция апоптоза в лимфоцитах золотой рыбки *C. auratus* [70]

Примечание. По оси абсцисс – интенсивность флюоресценции PI; по оси ординат – число событий. Область 1 – апоптотические клетки; область 2 – гемоциты в фазах G₀ и G₁ клеточного цикла; область 3 – S-фаза клеточного цикла; область 4 – G₂ и M фазы клеточного цикла. Гистограмма А – контроль (инкубация с ДМСО), гистограмма В – индукция апоптоза DDT.

формирующих так называемый «суб- G_1 » пик на гистограммах.

Выбор ДНК-связывающих красителей крайне широк и разнообразен. Среди них можно выделить несколько групп, основываясь на способе их взаимодействия с ДНК. Выделяют «интеркалирующие» красители, которые взаимодействуют с молекулами ДНК, встраиваясь в пространство между остатками нуклеотидов, находящимися в соседних нитях, например, бромистый этидий и йодистый пропидий. Красители, связывающиеся с малой бороздкой ДНК, такие как 6-диамино-2-фенилиндо́л (DAPI) и Hoechst. Еще одной их характеристикой является связывание с участками, обогащенными повторами аденина и тимина. В то время как с участками, обогащенными гуанином и цитозином, связываются такие красители как 7-аминоактиномицин D (7-AAD), митрамицин и хромамицин A3. Кроме того, красители могут отличаться по способности проникать через клеточную мембрану. Например, Hoechst способен спонтанно диффундировать через билипидный слой и связываться с ДНК в ядре живой клетки, тогда как большая часть красителей требует предварительной обработки клеток с целью нарушения целостности мембран — пермебиализации — для эффективного связывания с нуклеиновыми кислотами. В несвязанном с ДНК виде красители не обладают выраженной флюоресценцией — эти свойства у них появляются только после взаимодействия с нуклеиновыми кислотами. Красители также могут различаться по источникам света, применяемым для эффективного возбуждения их флюоресценции. Так, для эффективного возбуждения DAPI и Hoechst должны быть использованы ультрафиолетовые источники света, которые пока еще не получили широкого распространения. Поэтому в настоящее время широко распространенные получили ДНК-красители, для возбуждения которых применяют источники света с длиной 488 нм. К их числу, в первую очередь, относятся PI и 7-AAD. В качестве типичного примера окраски клеток ДНК-связывающими красителями можно привести гистограммы, представленные на рисунке 11, на которых представлены результаты окрашивания лимфоцитов золотой рыбки *Carassius auratus* йодистым пропидием [70]. Кроме того, в рамках изучения апоптоза ДНК-связывающие красители могут применяться для совместно окрашивания клеток вместе с различными другими красителями, ориентированными на выявления нарушения асимметрии клеточной мембраны, изменения мембранного потенциала

митохондрий, определения уровня активности каспаз и т.д.

Так как связывание красителя строго пропорционально количеству ДНК, находящемуся в ядре клетки, то на гистограмме можно выделить 4 основные области, соответствующие различным функциональным состояниям гемоцитов. Покоящиеся клетки (G_0) и клетки, находящиеся в пресинтетической фазе клеточного цикла (G_1), содержат равное количество ДНК (2N), которое соответствует диплоидному набору хромосом. Поэтому на гистограмме они будут находиться в составе одного пика — так называемого диплоидного (G_0/G_1) пика (область 2 на рисунке 11). Традиционно этот пик устанавливают в районе 200 канала линейной шкалы распределения интенсивности флюоресценции PI. В фазе синтеза (S фаза клеточного цикла) содержание ДНК постепенно возрастает с 2N до 4N, что сопровождается увеличением связывания PI и, как следствие, усилением интенсивности флюоресценции окрашенных PI клеток (область 3 на рисунке 11). В премитотической фазе (фаза G_2) и во время митоза (M-фаза) число хромосом и содержание ДНК удваиваются (4N). Следствием этого является то, что интенсивность флюоресценции клеток этих двух фаз клеточного цикла будет ровно в два раза превосходить таковую клеток, имеющих диплоидный набор ДНК. В том случае, если пик G_0/G_1 находится в районе 200 канала линейной шкалы, то пик G_2/M будет располагаться в районе 400 канала, что соответствует области 4 на рисунке 11. Что касается клеток, вступивших в апоптоз, то, как уже отмечалось выше, они будут располагаться левее пика G_0/G_1 , так как они несут неполный или гиподиплоидный набор ДНК (менее 2N). Именно поэтому они будут располагаться в области 1 на рисунке 11, формируя так называемый «суб- G_1 пик». Следует отметить, что в эту же область будут попадать и разрушенные во время пробоподготовки клетки и ядра, апоптотические тельца и клеточный дебрис. В рамках сравнительно-иммунологических исследований изучение апоптоза при помощи окраски клеток ДНК-красителями проводится на широком круге модельных объектов, что еще раз указывает на универсальность этого подхода. Встречаются упоминания об использовании DAPI для этих целей, в том числе при постановке экспериментов на гемоцитах моллюсков — устрицы *Crassostrea virginica* [28] и мидии *M. galloprovincialis* [6, 47]. Однако чаще всего применяют PI, что обусловлено простотой постановки реакции, низкой себестоимостью и доступностью данного красителя. Так, этот краситель успешно применялся для ра-

боты на представителях членистоногих — различные виды ракообразных [41], насекомых [49, 51], а также моллюсков — двусторчатых моллюсков *Cerastoderma edule* [39] и *M. arenaria* [16], как и низших позвоночных на примере костных рыб [9, 70], амфибий [20] и т.д. Наиболее подробно данная методика была описана при постановке экспериментов на лимфоцитах золотой рыбки *C. auratus* [69, 71]. Для постановки реакции использовали лимфоциты, выделенные при помощи центрифугирования в градиенте плотности фиколла из лейкоцитов головной почки и селезенки рыб. После проведения пробоподготовки определяли процент клеток, содержащих гиподиплоидный набор ДНК. Результаты анализа контрольного и опытного образца приведены на рисунке 11.

Таким образом, методы проточной цитофлуориметрии, предназначенные для изучения апоптоза, крайне разнообразны и могут найти широчайшее применение в различных областях биологической и медицинской науки. Кроме того, апоптоз является ключевым механизмом иммунорегуляции, а его нарушения имеют патогенетическую значимость в развитии многих заболеваний. Ключевую роль при выборе того или иного методического подхода для оценки механизмов клеточной гибели должны играть цель, поставленная перед исследователем в рамках эксперимента, также как и технические возможности его лаборатории. Упомянутые в обзоре методы могут быть с легкостью воспроизведены на проточных цитофлуориметрах, оснащенных стандартным аргоновым лазером, а большая часть применяемых для постановки реагентов доступна на территории нашей страны. В зависимости от условий и поставленных задач исследователь может комбинировать различные способы выявления апоптотических клеток для более детального описания интересующих его стадий апоптоза. Практически любой эксперимент с культурами живых клеток, проводимый в условиях *in vitro*, должен начинаться с оценки адекватности условий культивирования образцов. Аналогично, при оценке биологической активности различного рода веществ (фармакологические препараты, химические вещества, а также вещества животного или растительного происхождения) следует начинать с подбора оптимальных концентрации исследуемых агентов. В клинической практике, особенно при онкодиагностике, определение уровня апоптоза может являться критерием для выбора стратегии ведения пациентов и назначения ему адекватной терапии. Поэтому основной целью данного

обзора является знакомство широкой аудитории специалистов медико-биологического профиля с различными по своей доступности, простоте исполнения и информативности методами исследования апоптоза.

Список литературы

1. Abdelwahid E., Rolland S., Teng X., Conradt B., Hardwick J.M., White K. Mitochondrial involvement in cell death of non-mammalian eukaryotes // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2011. — Vol. 1813. — P. 597-607.
2. Adams S.L., Hessian P.A., Mladenov Ph.V. Flow cytometric evaluation of mitochondrial function and membrane integrity of marine invertebrate sperm // *Invert. Reprod. Dev.* — 2003. — Vol. 44. — P. 45-51.
3. Agnello M, Roccheri MC. Apoptosis: Focus on sea urchin development // *Apoptosis.* — 2010. — Vol. 15. — P. 322-330.
4. Baulny B.O., Vern Y., Kerboeuf D., Maisse G. Flow cytometric evaluation of mitochondrial activity and membrane integrity in fresh and cryopreserved rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa // *Cryobiology.* — 1997. — Vol. 34. — P. 141-149.
5. Betti M., Ciacci C., Lorusso L.C., Canonico B., Falcioni T., Gallo G., Canesi L. Effects of tumour necrosis factor α (TNF α) on *Mytilus* haemocytes: role of stress-activated mitogenactivated protein kinases (MAPKs) // *Biol. Cell.* — 2006. — Vol. 98. — P. 233-244.
6. Bihari N., Micic M., Batel R., Zahn R.K. Flow cytometric detection of DNA cell cycle alterations in hemocytes of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) off the Adriatic coast, Croatia // *Aquatic Toxicol.* — 2003. — Vol. 64. — P. 121-129.
7. Blankenberg F.G. In vivo imaging of apoptosis // *Cancer Biol. Ther.* — 2008. — Vol. 7. — P. 1525-1532.
8. Canesi L., Ciacci C., Betti M., Fabbri R., Canonico B., Fantinati A., Marcomini A., Pojana G. Immunotoxicity of carbon black nanoparticles to blue mussel hemocytes // *Envir. International.* — 2008. — Vol. 34. — P. 1114-1119.
9. Chang M.X., Wang Y.P., Nie P. Zebrafish peptidoglycan recognition protein SC (zfPGRP-SC) mediates multiple intracellular signaling pathways // *Fish Shellfish Immunol.* — 2009. — Vol. 26. — P. 264-274.
10. Chowdhury I., Tharakan B., Bhat G.K. Caspases - An update // *Comp. Biochem. Physiol., Part B.* — 2008. — Vol. 151. — P. 10-27.
11. Cima F., Manni L., Basso G., Fortunato E., Accordi B., Schiavon F., Ballarin L. Hovering between death and life: Natural apoptosis and phagocytes

- in the blastogenetic cycle of the colonial ascidian *Botryllus schlosseri* // Dev. Comp. Immunol. — 2010. — Vol. 34. — P. 272-285.
12. Cooper D.M., Granville D.J., Lowenberger C. The insect caspases // Apoptosis. — 2009. — Vol. 14. — P. 247-256.
 13. Cottet-Rousselle C., Ronot X., Leverage X., Mayol J.-F. Cytometric assessment of mitochondria using fluorescent probes // Cytometry Part A. — 2011. — Vol. 79A. — P. 405-425.
 14. Darzynkiewicz Z., Bruno S., Del Bino G., Gorczyca W., Hotz M.A., Lassota P., Traganos F. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry // Cytometry. — 1992. — Vol. 13. — P. 795-808.
 15. Darzynkiewicz Z., Huang X., Okafuji M. Detection of DNA strand breaks by flow and laser scanning cytometry in studies of apoptosis and cell proliferation (DNA replication) // Methods Mol. Biol. — 2006. — Vol. 314. — P. 81-93.
 16. Delaporte M., Synard S., Pariseau J., McKenna P., Tremblay R., Davidson J., Berthe F.C.J. Assessment of haemic neoplasia in different soft shell clam *Mya arenaria* populations from eastern Canada by flow cytometry // J. Invert. Pathol. — 2008. — Vol. 98. — P. 190-197.
 17. Deveraux Q.L., Reed J.C. IAP family proteins — suppressors of apoptosis // Genes Dev. — 1999. — Vol. 13. — P. 239-252.
 18. Devitt A., Marshall L.J. The innate immune system and the clearance of apoptotic cells // J. Leukoc. Biol. — 2011. — Vol. 90. — P. 447-457.
 19. Dive C., Gregory C.D., Phipps D.J., Evans D.L., Milner A.E., Wyllie A.H. Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multiparameter flow cytometry // Biochim. Biophys. Acta. — 1992. — Vol. 1133. — P. 275-285.
 20. Ducoroy P., Lesourd M., Padros M.R., Tournefier A. Natural and induced apoptosis during lymphocyte development in the axolotl // Dev. Comp. Immunol. — 1999. — Vol. 23. — P. 241-252.
 21. Elliott M.R., Ravichandran K.S. Clearance of apoptotic cells: implications in health and disease // J. Cell Biol. — 2010. — Vol. 189. — P. 1059-1070.
 22. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death // Toxicol. Pathol. — 2007. — Vol. 35. — P. 495-516.
 23. Engelsma M.Y., Hougee S., Nap D., Hofenk M., Rombout J.H.W.M., van Muiswinkel W.B., Verburg-van Kemenade B.M.L. Multiple acute temperature stress affects leucocyte populations and antibody responses in common carp, *Cyprinus carpio* L. // Fish Shellfish Immunol. — 2003. — Vol. 15. — P. 397-410.
 24. Fan T., Han L., Cong R., Liang J. Caspase family proteases and apoptosis // Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai). — 2005. — Vol. 37. — P. 719-727.
 25. Favret K.P., Lynn J.W. Flow-cytometric analyses of viability biomarkers in pesticide-exposed sperm of three aquatic invertebrates // Arch. Environ. Contam. Toxicol. — 2010. — Vol. 58. — P. 973-984.
 26. Ferlini C., Scambia G. Assay for apoptosis using the mitochondrial probes, Rhodamine123 and 10-N-nonyl acridine orange // Nature Protocols. — 2007. — Vol. 2. — P. 3111-3114.
 27. Filipiak M., Bilska E., Tylko G., Pyza E. Effects of zinc on programmed cell death of *Musca domestica* and *Drosophila melanogaster* blood cells // J. Insect Physiol. — 2010. — Vol. 56. — P. 383-390.
 28. Friedl F.E., Alvarez M.R., Johnson J.S., Gratzner H.G. Cytometric investigations on hemocytes of the American oyster, *Crassostrea virginica* // Tissue Cell. — 1988. — Vol. 20. — P. 933-939.
 29. Galliot B., Chera S. The Hydra model: disclosing an apoptosis-driven generator of Wnt-based regeneration // Trends Cell Biol. — 2010. — Vol. 20. — P. 514-523.
 30. Garner D.L., Johnson L.A. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide // Biol. Reprod. — 1995. — Vol. 53. — P. 276-284.
 31. Garner D.L., Johnson L.A., Yue S.T., Roth B.L., Haugland R.P. Dual DNA staining assessment of bovine sperm viability using SYBR-14 and propidium iodide // J. Androl. — 1994. — Vol. 15. — P. 620-629.
 32. Gorczyca W., Gong J., Darzynkiewicz Z. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays // Cancer Res. — 1993. — Vol. 53. — P. 1945-1951.
 33. Hood K.A., West L.M., Northcote P.T., Berridge M.V., Miller J.H. Induction of apoptosis by the marine sponge (*Mycale*) metabolites, mycalamide A and pateamine // Apoptosis. — 2001. — Vol. 6. — P. 207-219.
 34. Johnson L.V., Walsh M.L., Chen, L.B. Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123 // PNAS. — 1980. — Vol. 77. — P. 990-994.
 35. Kerr J., Wyllie A., Currie A. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging applications in tissue kinetic // British J. Cancer. — 1972. — Vol. 26. — P. 237-251.
 36. Kiss T. Apoptosis and its functional significance in mollusks // Apoptosis. — 2010. — Vol. 15. — P. 313-321.

37. Kitazumi I., Tsukahara M. Regulation of DNA fragmentation: the role of caspases and phosphorylation // *FEBS J.* – 2011. – Vol. 278. – P. 427-441.
38. Lasi M., David C.N., Bottger A. Apoptosis in pre-Bilaterians: *Hydra* as a model // *Apoptosis.* – 2010. – Vol. 15. – P. 269-278.
39. Le Grand F., Kraffe E., de Montaudouin X., Villalba A., Marty Y., Soudant P. Prevalence, intensity, and aneuploidy patterns of disseminated neoplasia in cockles (*Cerastoderma edule*) from Arcachon Bay: Seasonal variation and position in sediment // *J. Invert. Pathol.* – 2010. – Vol. 104. – P. 110-118.
40. Lee B.W., Olin M.R., Johnson G.L., Griffin R.J. In vitro and in vivo apoptosis detection using membrane permeant fluorescent-labeled inhibitors of caspases // *Meth. Mol. Biol.* – 2008. – Vol. 414. – P. 109-135.
41. Lezcano M., Granja C., Salazar M. The use of flow cytometry in the evaluation of cell viability of cryopreserved sperm of the marine shrimp (*Litopenaeus vannamei*) // *Cryobiology.* – 2004. – Vol. 48. – P. 349-356.
42. Li X., Darzynkiewicz Z. Labelling DNA strand breaks with BrdUTP. Detection of apoptosis and cell proliferation // *Cell Prolif.* – 1995. – Vol. 28. – P. 571-579.
43. Liu L., Wu C., Chen T., Zhang X., Lia F., Luo W., Xiang J. Effects of infection of EGFP-expressing *Escherichia coli* on haemocytes in *Ciona intestinalis* // *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* – 2006. – Vol. 332. – P. 121-134.
44. Lu X.Y., Wu R.S.S. Ultraviolet damages sperm mitochondrial function and membrane integrity in the sea urchin *Anthodidaris crassispina* // *Ecotoxicol. Environmen. Safety.* – 2005. – Vol. 61. – P. 53-59.
45. Mamali I., Tatari M.N., Micheva I., Lampropoulou M., Marmaras V.J. Apoptosis in medfly hemocytes is regulated during pupariation through FAK, Src, ERK, PI-3K p85a, and Akt survival signaling // *J. Biol. Chem.* – 2007. – Vol. 101. – P. 331-347.
46. Maxwell W.M.C., Long C.R., Johnson L.A., Dobrinsky J.R., Welch G.R. The relationship between membrane status and fertility of boar spermatozoa after flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma // *Reprod. Fertil. Dev.* – 1998. – Vol. 10. – P. 433-440.
47. Micic M., Bihari N., Labura Z., Muller W.E.G., Batel R. Induction of apoptosis in the blue mussel *Mytilus galloprovincialis* by tri-*n*-butyltin chloride // *Aquatic Toxicol.* – 2001. – Vol. 55. – P. 61-73.
48. Morga B., Arzul I., Chollet B., Renault T. Infection with the protozoan parasite *Bonamia ostreae* modifies in vitro haemocyte activities of flat oyster *Ostrea edulis* // *Fish Shellfish Immunol.* – 2009. – Vol. 26. – P. 836-842.
49. Nagasaka K., Nakagawa S., Yano T., Takizawa S., Matsumoto Y., Tsuruga T., Nakagawa K., Minaguchi T., Oda K., Hiraike-Wada O., Ooishi H., Yasugi T., Taketani Y. Human homolog of *Drosophila* tumor suppressor Scribble negatively regulates cell-cycle progression from G1 to S phase by localizing at the basolateral membrane in epithelial cells // *Cancer Sci.* – 2006. – Vol. 97. – P. 1217-1225.
50. Orrenius S., Gogvadze V., Zhivotovsky B. Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death // *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 2007. – Vol. 47. – P. 143-183.
51. Ottaviani E., Barbieri D., Malagoli D., Franchini A. Nitric oxide induces apoptosis in the fat body cell line IPLB-LdFB from the insect *Lymantria dispar* // *Comp. Biochem. Physiol. Part B.* – 2001. – Vol. 128. – P. 247-254.
52. Paniagua-Chavez C.G., Jenkins J., Segovia M., Tiersch T.R. Assessment of gamete quality for the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) by use of fluorescent dyes // *Cryobiology.* – 2006. – Vol. 53. – P. 128-138.
53. Pozarowski P., Huang X., Halicka D.H., Lee B., Johnson G., Darzynkiewicz Z. Interactions of fluorochrome-labeled caspase inhibitors with apoptotic cells: a caution in data interpretation // *Cytometry Part A.* – 2003. – Vol. 55A. – P. 50-60.
54. Xue Q.-G., Renault T., Chilmoneczyk S. Flow cytometric assessment of haemocyte subpopulations in the European flat oyster, *Ostrea edulis*, haemolymph // *Fish Shellfish Immunol.* – 2001. – Vol. 11. – P. 557-567.
55. Robertson A.J., Croce J., Carbonneau S., Voronina E., Miranda E., McClay D.R., Coffman J.A. The genomic underpinnings of apoptosis in *Strongylocentrotus purpuratus* // *Dev. Biol.* – 2006. – Vol. 300. – P. 321-334.
56. Romero A., Estevez-Calvar N., Dios S., Figueras A., Novoa B. New insights into the apoptotic process in mollusks: characterization of caspase genes in *Mytilus galloprovincialis* // *PLoS ONE.* – 2011. – Vol. 6, e17003. – P. 1-15.
57. Roy N., Deveraux Q.L., Takahashi R., Salvesen G.S., Reed J.C. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases // *EMBO J.* – 1997. – Vol. 16. – P. 6914-6925.
58. Russo J., Madec L. Haemocyte apoptosis as a general cellular immune response of the snail, *Lymnaea stagnalis*, to a toxicant // *Cell Tissue Res.* – 2007. – Vol. 328. – P. 431-441.
59. Saha N.R., Suetake H., Kikuchi K., Suzuki Yu. Effects of steroid hormones on apoptosis and IgM

production of LPS-stimulated lymphocytes in fugu *Takifugu rubripes* // Fisheries Science. – 2006. – Vol. 72. – P. 136-142.

60. Saha N.R., Usami T., Suzuki Yu. A double staining flow cytometric assay for the detection of steroid induced apoptotic leucocytes in common carp (*Cyprinus carpio*) // Dev. Comp. Immunol. – 2003. – Vol. 27. – P. 351-363.

61. Saha N.R., Usami T., Suzuki Yu. In vitro effects of steroid hormones on IgM-secreting cells and IgM secretion in common carp (*Cyprinus carpio*) // Fish Shellfish Immunol. – 2004. – Vol. 17. – P. 149-158.

62. Salinas I., Rodriguez A., Meseguer J., Esteban M.A. Adenosine arrests apoptosis in lymphocytes but not in phagocytes from primary leukocyte cultures of the teleost fish, *Sparus aurata* L. // Dev. Comp. Immunol. – 2007. – Vol. 31. – P. 1233-1241.

63. Verhoven B., Schlegel R.A., Williamson P. Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes // J. Exp. Med. – 1995. – Vol. 182. – P. 1597-1601.

64. Vermes I., Haanen C., Reutelingsperger C. Flow cytometry of apoptotic cell death // J. Immunol. Meth. – 2000. – Vol. 243. – P. 167-190.

65. Walsh C.M., Edinger A.L. The complex interplay between autophagy, apoptosis, and necrotic signals promotes T-cell homeostasis // Immunol. Rev. – 2010. – Vol. 236. – P. 95-109.

66. Wlodkowic D., Skommer J., Darzynkiewicz Z. Flow cytometry-based apoptosis detection // Meth. Mol. Biol. – 2009. – Vol. 559. – P. 19-32.

67. Wlodkowic D., Telford W., Skommer J., Darzynkiewicz Z. Apoptosis and beyond: cytometry in studies of programmed cell death // Methods in Cell Biology. – 2011. – Vol. 103. – P. 55-98.

68. Wohllebe S., Ulbrich C., Grimm D., Pietsch J., Erzinger G., Richter R., Lebert M., Richter P.R., Hader D.P. Photodynamic treatment of *Chaoborus crystallinus* larvae with chlorophyllin induces necrosis and apoptosis // Photochem Photobiol. – 2011. – Vol. 87. – P. 1113-1122.

69. Xiang L., Peng B., Dong W., Yang Z., Shao J. Lipopolysaccharide induces apoptosis in *Carassius auratus* lymphocytes, a possible role in pathogenesis of bacterial infection in fish // Dev. Comp. Immunol. – 2008. – Vol. 32. – P. 992-1001.

70. Zhang H., Zhang J., Zhu Y. In vitro investigations for the QSAR mechanism of lymphocytes apoptosis induced by substituted aromatic toxicants // Fish Shellfish Immunol. – 2008. – Vol. 25. – P. 710-717.

71. Zhang L., Li L., Zhang G. Gene discovery, comparative analysis and expression profile reveal the complexity of the *Crassostrea gigas* apoptosis system // Dev. Comp. Immunol. – 2011. – Vol. 35. – P. 603-610.

72. Zhivotovsky B., Orrenius S. Current concepts in cell death // Curr. Protoc. Cell Biol. – 2001. – Chapter 18. – Unit 18.1.

73. Zhivotovsky B. Apoptosis, necrosis and between // Cell Cycle. – 2004. – Vol. 3. – P. 64-66.

поступила в редакцию 10.02.2012

принята к печати 22.02.2012