

На правах рукописи



Савицкая Маргарита Анатольевна

**СЕЛЕКТИВНОЕ ВЛИЯНИЕ СУКЦИНАТА ВИТАМИНА Е НА
ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ И КЛЕТОЧНУЮ ПОДВИЖНОСТЬ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ
НОРМАЛЬНЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЭПИДЕРМАЛЬНОГО
ПРОИСХОЖДЕНИЯ**

Специальность 03.03.04
Клеточная биология, цитология, гистологи

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2016

Работа выполнена на кафедре клеточной биологии и гистологии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Научный руководитель:

Онищенко Галина Евгеньевна, доктор биологических наук, заведующий кафедрой клеточной биологии и гистологии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Официальные оппоненты:

Домарацкая Елена Ивановна, доктор биологических наук, заведующий лабораторией клеточных и молекулярных основ гистогенеза Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова» РАН, Москва.

Рыбалкина Екатерина Юрьевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории генетики опухолевых клеток Федерального государственного бюджетного учреждения «Российский Онкологический Научный Центр им. Н.Н.Блохина» Министерства Здравоохранения Российской Федерации, Москва.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт морфологии человека», Москва.

Защита состоится 13 декабря 2016 года в 15.30 на заседании диссертационного совета Д 501.001.52 при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские Горы, д.1, стр.12, Биологический факультет, аудитория М-1.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова и на официальном сайте МГУ <http://www.istina.msu.ru>

Автореферат разослан

2016 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Калистратова Е.Н.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Злокачественные новообразования – одна из наиболее распространённых причин смерти во всём мире. Большинство из них с трудом поддаётся лечению, а применяемые на сегодняшний день терапевтические методы обладают значительными побочными эффектами. В связи с этим большой интерес представляют агенты, обладающие противоопухолевым действием и при этом не нарушающие жизнедеятельность нормальных клеток и тканей. Одной из групп подобных соединений являются «митоканы» – низкомолекулярные вещества с селективным противоопухолевым эффектом, воздействующие в первую очередь на митохондрии злокачественных клеток (Rodriguez-Enriquez et al., 2009; Dong et al., 2011; Bjelakovic et al., 2012). Наиболее известные соединения из группы митоканов – производные антиоксиданта витамина Е, в т.ч. α -токоферилсукцинат (сукцинат витамина Е, СВЕ), представляющий собой сложный эфир янтарной кислоты и α -токоферола. В то время как сам по себе α -токоферол практически не оказывает влияние на опухолевые клетки, проявления биологической активности СВЕ по отношению к злокачественно трансформированным клеткам разнообразны. Так, на различных линиях культивируемых клеток, а также в экспериментах *in vivo* показано, что СВЕ обладает прооксидантными свойствами, он способен индуцировать апоптотическую гибель по митохондриальному механизму (Shiau et al., 2006, Gogvadze et al., 2010; Prochazka L et al., 2010). Помимо этого, СВЕ проявляет и другие типы биологической активности, такие как влияние на прохождение клеток по клеточному циклу (Yu et al., 2002, Ni et al., 2003, Alleva et al., 2005), индукция дифференцировки (Turley et al., 1992; You et al., 2001, 2002), подавление способности опухолевых клеток к адгезии (Wang et al., 2009), усиление эффектов других противоопухолевых агентов (Kanai et al., 2010; Tomasetti et al., 2010; Kruspig et al., 2013), радиопротекторное действие по отношению к нормальным клеткам и тканям (Singh et al., 2010, 2012). Тем не менее, механизмы воздействия СВЕ на клетки изучены весьма неполно; кроме того, они могут различаться в зависимости от типа клеток. Исследование действия СВЕ на нормальные и опухолевые клетки представляет собой перспективное направление как фундаментальной, так и прикладной биологии. Подробное знание механизмов противоопухолевых эффектов, оказываемых СВЕ, способствует лучшему пониманию процессов программируемой гибели клеток, а также создаёт перспективу использования противоопухолевого препарата, селективного по отношению к трансформированным клеткам и обладающего минимальными побочными эффектами.

Степень разработанности темы. Показано проапоптотное действие СВЕ по отношению к широкому спектру клеточных линий различного происхождения – эпителиального, лимфоидного, мезенхимального и нейрального происхождения. При этом оказалось, что нормальные клетки проявляют устойчивость к воздействию данного агента, и концентрации последнего, токсичные для опухолевых клеток, не индуцируют гибель нормальных клеток (Neuzil et al., 2001; Zhao et al., 2009). Механизмы воздействия СВЕ на опухолевые клетки могут значительно отличаться в разных типах клеток; в большинстве

случаев продемонстрирован митохондриальный путь апоптоза. В свою очередь, способы его индукции также разнообразны. Это окислительный стресс, конкурентное ингибирование комплексов дыхательной цепи, активация проапоптозных белков и др. Но, чаще всего описывается только одна или немногие мишени воздействия СВЕ и варианты клеточного ответа. Известно, что новообразования кожи обладают высокой злокачественностью и трудно поддаются терапии, при этом исследования действия СВЕ на опухолевые клетки, происходящие из многослойного эпителия, практически отсутствуют.

Цель и задачи работы. Целью работы было сопоставить реакцию нормальных и опухолевых клеток эпидермального происхождения на действие сукцината витамина Е. В работе были поставлены следующие задачи:

на культивируемых клетках эпидермоидной карциномы человека А431 и нормальных кератиноцитов НаСаТ:

1. оценить способность СВЕ индуцировать гибель клеток и определить тип гибели клеток;
2. для определения механизма клеточной гибели и исследования участия различных органелл оценить их состояние в контроле и при воздействии СВЕ на световом и ультраструктурном уровне;
3. оценить влияние СВЕ на клеточную подвижность; исследовать форму клеток, площадь, занимаемую клетками, состояние клеточной поверхности и систему актиновых филаментов в контроле и при воздействии;
4. для поиска различий в реакции нормальных и злокачественно трансформированных клеток сравнить эффекты воздействия СВЕ на культивируемые нормальные и опухолевые клетки человека.

Научная новизна работы. Впервые получены данные о воздействии СВЕ на клетки эпидермоидной карциномы линии А431 и нормальные кератиноциты линии НаСаТ, описано состояние митохондрий, ЭПР, АГ на световом и ультраструктурном уровне. Показано, что в клетках линии эпидермоидной карциномы человека СВЕ дозозависимо индуцирует апоптоз по митохондриальному пути. Наблюдается изменение морфологии митохондрий как на световом, так и на ультраструктурном уровне, происходит выход цитохрома *c* в цитозоль, что является ключевым событием митохондриального пути апоптоза. При этом в нетуморогенных кератиноцитах НаСаТ апоптоз происходит при более высоких концентрациях агента и протекает по немитохондриальному механизму. В обеих клеточных культурах показано изменение формы клеток, реорганизация актинового цитоскелета, сглаживание клеточной поверхности, а также подавление клеточной подвижности. Данные эффекты сходны в обеих линиях клеток, но в культуре НаСаТ они имеют место при более высоких концентрациях СВЕ, чем требуются для А431. Таким образом, показана селективность названного соединения по отношению к опухолевым клеткам, происходящим из многослойных эпителиев кожи человека.

Теоретическая и практическая ценность работы. Данная работа позволяет получить новую важную информацию о механизмах воздействия α -токоферилсукцината на опухолевые и нормальные клетки человека. Полученные результаты актуальны и имеют как теоретическую, так и биомедицинскую значимость. Они могут быть использованы в дальнейших исследованиях, направленных на разработку противоопухолевых препаратов с селективным действием.

Методология и методы исследования. В работе применялись как классические, так и современные методы исследования: культивирование эукариотических клеток, иммуноцитохимическое и цитохимическое выявление клеточных органелл, морфометрический анализ, методы флуоресцентной микроскопии, трансмиссионной и сканирующей электронной микроскопии, модель раны *in vitro*.

Личное участие автора. Вся работа диссертанта была выполнена самостоятельно и включала в себя анализ научной литературы, разработку экспериментальной части, получение и обработку результатов, статистический анализ данных.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность результатов подтверждается анализом современного состояния вопроса, адекватностью использованных методических подходов, статистическим анализом полученных данных. Материалы работы были представлены на 5 всероссийских и 5 международных научных конференциях. Опубликовано 6 статей в научных журналах из списка ВАК.

Структура диссертации. Работа изложена на 119 листах машинописного текста и дополнена иллюстративным материалом в количестве 46 рисунков. Она содержит введение, обзор литературы, описание материалов и методов, результаты, их обсуждение, заключение, выводы и список литературы (содержит 182 источника).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Биологический материал. Работу проводили на культурах клеток линии A431 (эпидермоидная карцинома человека) (Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург) и HaCaT (перевиваемая линия нормальных кератиноцитов человека, любезно предоставлены Е.А. Воротеляк, Институт биологии развития им.Н.К. Кольцова РАН, Москва). Клетки выращивали во флаконах на 5 мл в среде DMEM (Dulbecco modified Eagle's medium) (ПанЭко, Россия) с добавлением 10% фетальной сыворотки теленка (ПанЭко, Россия), 2 mM L-глутамина (ПанЭко, Россия) и 5 мг/мл гентамицина (ПанЭко, Россия). Клетки культивировали при 37°C и 5% CO₂. Пассирование производили раствором Версен-трипсина (7:3) (ПанЭко, Россия).

Постановка эксперимента. Клетки рассаживали на стекла в чашки Петри в концентрации 200-300 тыс/мл. Растворы α -токоферилсукцината (Sigma, США) приготавливали из стокового спиртового (96% этанол) раствора концентрацией 100 mM и хранили при -20°C. Агент вносили в среду культивирования через 24 ч после посадки в

концентрациях 20 мкМ, 40 мкМ, 60 мкМ и 100 мкМ. Так как в качестве растворителя для СВЕ применяли этанол, в каждом эксперименте было использовано два контроля: контроль без добавления каких-либо растворов и контроль с добавлением спирта. Далее клетки фиксировали или окрашивали прижизненно через 24, 48 или 72 ч после добавления СВЕ в соответствии с поставленной задачей.

Оценка жизнеспособности клеток методом МТТ-теста. Клетки высаживали в 96-луночное плато, внося в каждую лунку по 90 мкл среды с суспензией клеток. Через 24 ч культивирования в каждую лунку добавляли по 10 мкл 96 этилового спирта или 10 мкл спиртового раствора СВЕ в необходимой концентрации и инкубировали в течение 48 ч. Оптическую плотность определяли на спектрофотометре Униплан (Пикон, Россия).

Световая микроскопия в светлом поле. Клетки фиксировали 30 мин фиксатором Буэна и окрашивали гематоксилином и эозином по стандартной методике. На препаратах подсчитывали число апоптозов на 1000-1500 клеток. Идентификацию апоптотических клеток проводили по морфологическим признакам, таким как уплотнение цитоплазмы, конденсация хроматина, блэббинг и распад на апоптотические тельца.

Прижизненные наблюдения. Прижизненные наблюдения использовали для оценки доли клеток с избытком активных форм кислорода (АФК) и окрашивания кислого везикулярного компартмента. Для выявления активных форм кислорода в среду добавляли 2',7'-дихлорофлуоресцеиндиацетат (DCFH-DA) (BioChemika, США). Для выявления везикул кислого компартмента был использован краситель акридиновый оранжевый (Sigma, США). Наблюдения и съёмку всех препаратов с флуоресценцией проводили на люминесцентном микроскопе Axiovert 200M (Carl Zeiss Inc.), снабжённом чёрно-белой цифровой камерой Carl Zeiss AxioCam и программным обеспечением AxioVision 3.1. На полученных снимках производили подсчёт доли АФК-положительных клеток.

Цитохимическое и иммуноцитохимическое окрашивание фиксированных клеток. Клетки фиксировали 4% формалином на PBS в течение 20 мин и трижды промывали буфером. Фиксированные клетки на 3–5 мин помещали в 1% раствор Triton X100 при комнатной температуре. Для выявления полимеризованного актина был использован меченый TRITC фаллоидин (Sigma-Aldrich, США): стоковый раствор 1 мг/мл, разведённый на метаноле, рабочий раствор 0,005 мг/мл, разведённый на PBS. Время инкубации с красителем – 45 минут при 37° С во влажной камере. Иммуноцитохимическое окрашивание проводили по стандартной методике. В качестве **первичных антител** использовали: моноклональные антитела мыши к активной форме каспазы-3, моноклональные антитела мыши к резидентной последовательности белков ЭПР KDEL, моноклональные антитела мыши к белку аппарата Гольджи 58K, поликлональные антитела овцы к цитохрому *c*. В качестве **вторичных антител** использовали: моноклональные антитела к IgG мыши, конъюгированные с FITC и Alexa-488, антитела к IgG овцы, конъюгированные с Alexa Fluor-546. Препараты заключали в смесь глицерин:PBS (1:1), смесь PBS:глицерин:DAPI (1:1, 100 нМ) или мовиол.

Выявление митохондрий. Для визуализации хондриома были использованы флуоресцентные красители MitoTracker Orange CMTRos и MitoTracker Green FM. Красители вносили в среду культивирования в концентрации 100 нМ на 30 мин, после чего клетки отмывали в среде DMEM, не содержащей сыворотки, помещали в PBS и далее фиксировали 4% формальдегидом на PBS. Препараты заключали в смесь PBS:глицерин (1:1).

Оценка площади клеток. Площадь клеток A431 и HaCaT измеряли на фотографиях, полученных методом фазово-контрастной микроскопии на люминесцентном микроскопе Axiovert 200M (Carl Zeiss Inc.), в программе ImageJ.

Трансмиссионная электронная микроскопия. Клетки фиксировали 2,5% глутаровым альдегидом с 2% формалином на 0,1M PBS pH 7,2 (Sigma) и дофиксировали 1% OsO₄. После этого стёкла с клетками подготавливали по стандартной методике. Препараты анализировали с помощью трансмиссионного электронного микроскопа JEM-1011 (JEOL, 2005г) с цифровой фотокамерой GATAN ES500W, работающей под управлением программы Digital Micrograph фирмы GATAN и трансмиссионного электронного микроскопа JEM-100B (JEOL, 1974 г.) с цифровой фотокамерой OLYMPUS C-770 под управлением программы ImageScope (ООО "СМА").

Сканирующая электронная микроскопия. Клетки фиксировали 2,5% глутаровым альдегидом с 2% формалином на 0,1M PBS и проводили по стандартной методике. После обработки образец высушивали в критической точке (для CO₂ t = 31°C, p = 73,8 bar). Производили напыление на образец металлов Au-Pd. Препараты анализировали на сканирующем электронном микроскопе SCAN JSM («JEOL»).

Модель раны *in vitro*. Клетки сажали в чашки Петри на стёкла в концентрации 350-450 тыс./мл. На 2-е сутки поле посадки с помощью скребка для клеток наносили экспериментальную рану, а также вносили растворы СВЕ и этанола. Сразу после нанесения и спустя 24 ч инкубации в присутствии СВЕ получали изображение ран с помощью цифровой камеры на микроскопе с дифференциально-интерференционным контрастом (DIC) Leica (объектив HI Plan10×/0,22) с цифровой камерой VideoZavr Standart 3.533 и программным обеспечением VideoZavr 1.4. На каждую точку производили 100-115 измерений.

Обработка и анализ результатов. Обработку фотографий и измерение ширины экспериментальной раны проводили в программах Adobe Photoshop CS3 и ImageJ. Подсчёт числа апоптотических клеток производили на 1000-1500 клеток. Построение диаграмм и вычисление величин стандартного отклонения проводили в программе Microsoft Office Excel 2007. Каждый эксперимент был повторён не менее 3 раз. Уровень значимости p вычисляли по U-критерию Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

СВЕ вызывает апоптотическую гибель клеток A431, и его эффект зависит от концентрации и продолжительности воздействия

Как в контроле, так и при воздействии были обнаружены апоптотические клетки, которые идентифицировали по ряду критериев, таких как ошаривание, уплотнение цитоплазмы, конденсация хроматина, блеббинг и распад на апоптотические тельца (*рис. 1а*).

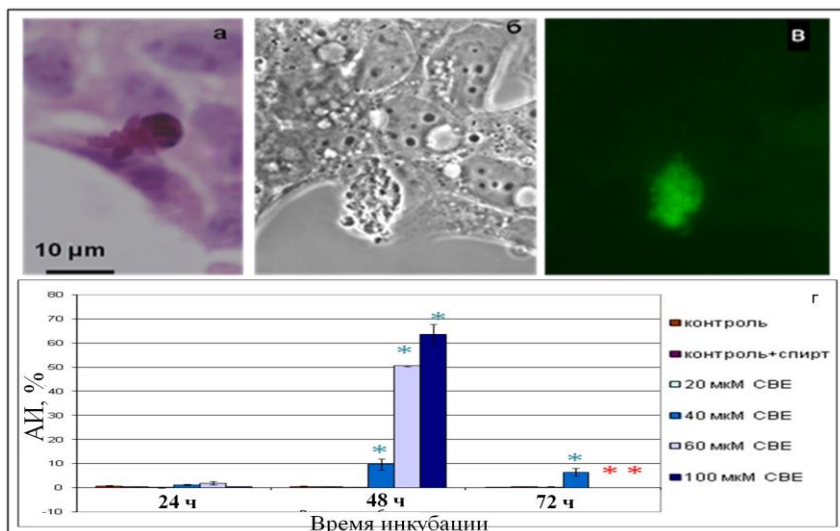


Рис. 1. Апоптоз в культуре клеток A431. а – окраска гематоксилином и эозином; б- фазовый контраст; в - иммуноцитохимическое выявление каспазы-3 в клетке, показанной на «б», г – зависимость величины АИ от концентрации СВЕ и времени воздействия.

В клетках, имеющих морфологические признаки апоптоза, обнаружено присутствие активной каспазы-3 (*рис. 1б,в*), что является доказательством каспазо-зависимого пути апоптоза. При оценке апоптотического индекса (АИ) было обнаружено, что при концентрациях от 40 мкМ через 48 ч инкубации происходит значительное увеличение величины АИ (через 48 ч при 40 мкМ – до 9,7 %, сохраняясь на том же уровне и через 72 ч, при 60 мкМ – до 50,9%, при 100 мкМ – до 63,4%). Через 72 ч при 60 и 100 мкМ СВЕ клетки на стеклах не обнаруживаются (*рис. 1г*). Оценка жизнеспособности клеток A431, проведённая с помощью МТТ-теста, в целом соответствует результатам подсчёта АИ и так же демонстрирует дозозависимость цитотоксического эффекта СВЕ. Таким образом, под действием СВЕ увеличивается уровень гибели клеток A431, причем эффект зависит от концентрации и продолжительности воздействия. При концентрации СВЕ, равной 40 мкМ, и инкубации в течение 48 ч величина АИ заметно повышается, но массовая гибель клеток еще не происходит, поэтому данная доза была выбрана для изучения механизма индукции апоптоза и исследования реакции клеток на воздействие.

СВЕ вызывает изменение структуры митохондрий и выход цитохрома с из митохондрий в цитозоль

Локализацию цитохрома с определяли иммуноцитохимическим методом.

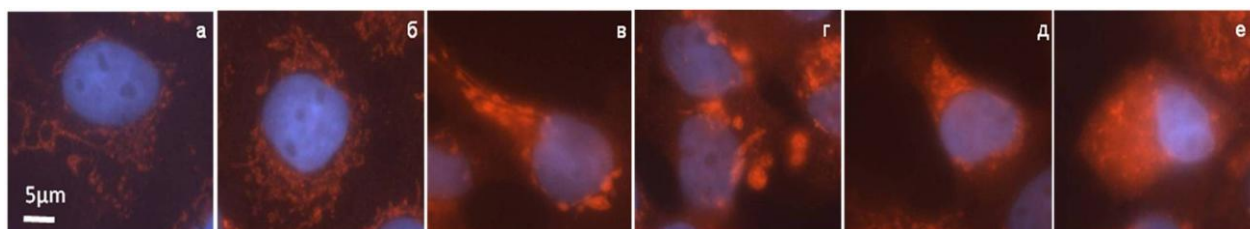


Рис. 2. Иммуноцитохимическое выявление цитохрома с в клетках A431: а, б – контроль, в-е – 40 мкМ СВЕ, 48 ч.

В то время как в контроле цитохром с выявляется в составе небольших, многочисленных и, как правило, нитевидных митохондрий, после воздействия можно проследить различную степень окрашивания цитоплазмы и разное количество окрашенных митохондрий, что свидетельствует о выходе цитохрома с из некоторых митохондрий в цитозоль. Размеры и форма митохондрий также изменяются. (рис.2в-е). Таким образом, при воздействии 40 мкМ СВЕ в течение 48 ч наблюдается выход цитохрома с из митохондрий в

цитозоль, но часть митохондрий сохраняют его в своём составе.

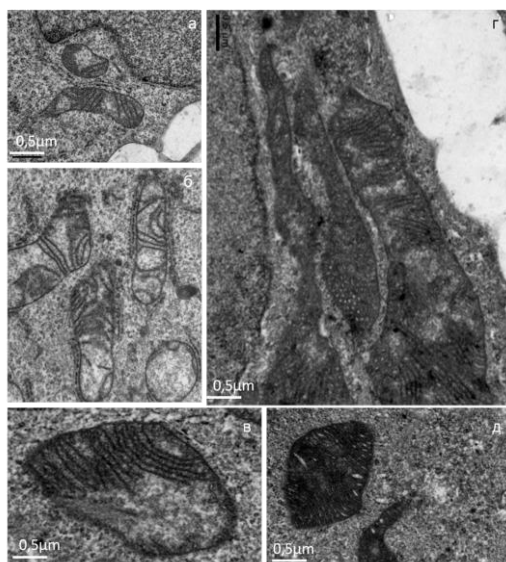


Рис.3. Ультраструктура митохондрий в клетках A431: а – контроль, б – контроль с добавлением спирта, в, г, д – 40 мкМ СВЕ, 48 ч

На ультраструктурном уровне при воздействии СВЕ обнаруживается разнородная популяция митохондрий: 1) митохондрии со светлым матриксом и небольшим количеством крист, 2) гигантские митохондрии с многочисленными тонкими кристами и светлым матриксом; 3) митохондрии с умеренным количеством крист и электронно-плотным матриксом, при этом некоторые кристы могут быть расширены (рис.3г-д). Митохондрии различных типов нередко могут присутствовать в одной и той же клетке.

СВЕ повышает уровень АФК в клетках линии A431

Воздействие 40 мкМ СВЕ в течение 48 ч приводит к значительному повышению количества клеток, окрашенных DCFH-DA (рис.4).

Таким образом, СВЕ индуцирует апоптотическую гибель в клетках эпидермоидной карциномы человека A431; эффект зависит от концентрации и времени воздействия. Митохондрии являются мишенью для действия СВЕ, который вызывает изменения их морфологии как на световом, так и на ультраструктурном уровне, а также способствует усилению образования кислородных радикалов и выходу цитохрома с. Можно сделать вывод, что СВЕ в клетках A431 индуцирует апоптоз по митохондриальному механизму.

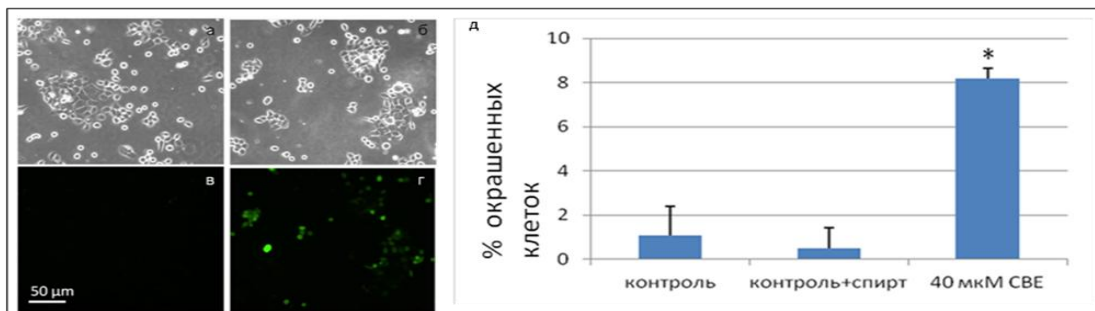


Рис. 4. Прижизненное выявление пероксида водорода в клетках A431: доля окрашенных клеток в контроле и при воздействии 40 мкМ СВЕ в течение 48 ч.

Воздействие СВЕ вызывает реорганизацию одномембранных органелл клеток A431

При действии 40 мкМ СВЕ в отдельных клетках, окрашенных антителами к белкам ЭПР, встречаются области, имеющие вид крупных кластеров. При этом в контроле подобные кластеры обнаружены не были. С помощью метода ТЭМ показано, что после воздействия СВЕ в клетках обнаруживаются как цистерны грЭПР, по структуре сходные с таковыми в контроле, так и претерпевающие различные изменения. Так, могут появляться протяжённые участки, лишённые рибосом, а также возникать локальные расширения каналов ЭПР. Обнаруженные изменения состояния одномембранных органелл могут служить признаками их стресса. При этом стресс грЭПР может сопровождаться стрессом аппарата Гольджи (Wlodkowic et al., 2009).

Обнаружено, что в то время как в контроле АГ имеет вид протяжённой области, прилежащей к ядру, в клетках, культивировавшихся в присутствии СВЕ, АГ приобретает вид отдельных компактных кластеров (рис.5).

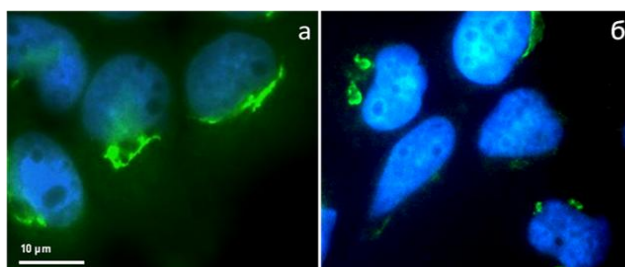


Рис. 5. Иммуноцитохимическое выявление аппарата Гольджи в клетках A431: а – контроль, б – 40 мкМ СВЕ.

ТЭМ показала, что в клетках, подвергавшихся воздействию, цистерны аппарата Гольджи значительно расширяются; при этом расширенными оказываются как цис-, так и медиальные и транс-части. Окрашивание акридиновым оранжевым выявило, что после инкубации с СВЕ происходит значительное увеличение числа и размеров везикул кислого компартмента; кроме того, обнаруживается окрашивание цитоплазмы, которое может свидетельствовать об утечке красителя вследствие повреждения мембран. Таким образом, СВЕ в концентрации 40 мкМ вызывает изменение морфологии одномембранных органелл в клетках эпидермоидной карциномы: грЭПР формирует кластеры на световом уровне и претерпевает ряд ультраструктурных изменений, аппарат Гольджи кластеризуется вблизи ядра, его цистерны расширяются, в цитоплазме увеличивается содержание везикул, что может служить признаками стресса.

СВЕ вызывает изменение морфологии клеток и их поверхности, реорганизацию сети актиновых филаментов и снижение подвижности клеток A431

При действии СВЕ в концентрации 40 мкМ в течение 48 ч в клетках A431 цитоплазма поджимается, снижается выраженность ламелл, клетки формируют многочисленные выросты и филоподии, содержащие F-актин.

Также при воздействии 40 мкМ СВЕ значительно (в два раза) снижается величина площади клеток (рис. 6). Очевидно, что это происходит из-за реорганизации элементов

цитоскелета и поджатия цитоплазмы.

Поскольку величина площади клеток снижается, возникает вопрос, происходит ли это вследствие изменения формы или/и размеров клеток. Форму клеток анализировали методом СЭМ.

Клетки,

подвергающиеся воздействию СВЕ, приобретают веретеновидную форму, а поверхность их значительно сглаживается и часто бывает практически лишена микроворсинок (рис. 7).

Подвижность клеток оценивали с помощью модели раны *in vitro*. Обнаружено, что в результате воздействия СВЕ процесс заживления раны значительно подавляется: в то время как в контроле ширина раны уменьшалась в 4 раза, в присутствии СВЕ – только в 1,5 (рис. 8).

Таким образом, СВЕ в концентрации 40 мкМ индуцирует изменения формы клеток A431, сопровождающиеся перестройкой системы актиновых филаментов. При этом происходит исчезновение микроворсинок с поверхности клеток. При воздействии СВЕ подавляется эффективность заживления экспериментальной раны в монослое по сравнению с контролем, что свидетельствует о снижении подвижности клеток.

Рис. 7. Вид клеток A431 в сканирующий электронный микроскоп: а – контроль, б – 40 мкМ СВЕ, 48 ч.

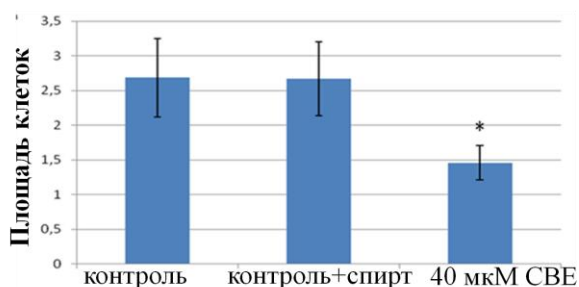
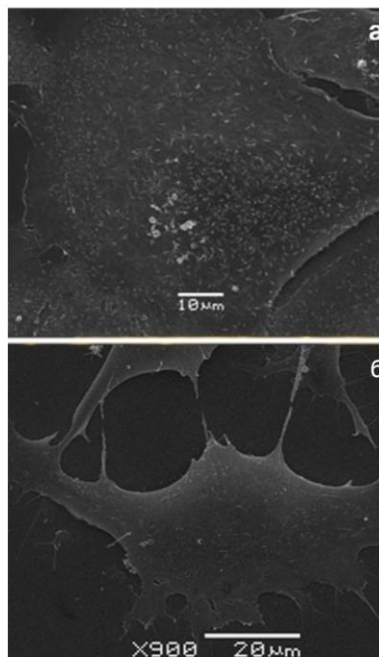


Рис. 6. Площадь клеток A431. По оси абсцисс отложены условия культивирования (контроли или концентрация СВЕ), по оси ординат – величина площади клеток, выраженная в относительных единицах.



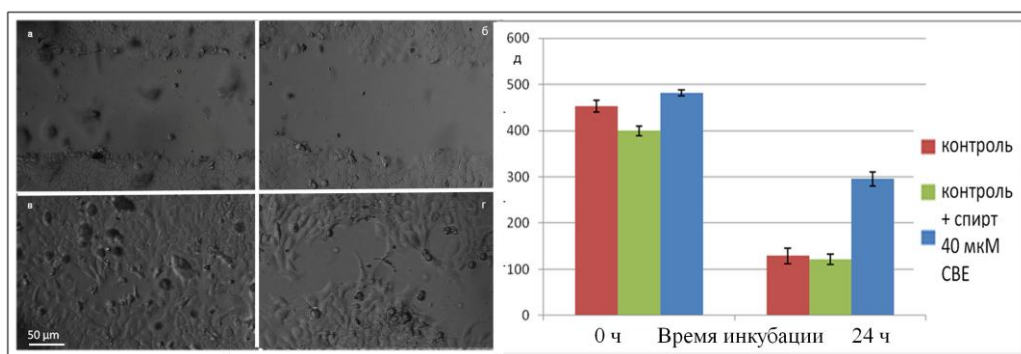


Рис. 8. Модель раны *in vitro* в культуре клеток A431: а – контроль, 0 ч, б – 40 мкМ CBE, 0 ч, в – контроль, 24 ч, г – 40 мкМ CBE, 24 ч, фазово-контрастная микроскопия; д - изменение ширины раны при моделировании раны *in vitro* в культуре клеток A431, по оси абсцисс ширина раны отложена в относительных единицах.

СВЕ вызывает апоптотическую гибель в клетках линии HaCaT при более высоких концентрациях, чем в линии A431

При исследовании воздействия СВЕ на клетки культуры HaCaT так же, как и в культуре A431, был обнаружен только апоптотический тип гибели, что подтверждается как морфологическими признаками (блэббинг, конденсация хроматина и уплотнение цитоплазмы, распад на апоптотически тельца), так и иммуноцитохимическим выявлением

активной каспазы-3 (рис. 10а-в).

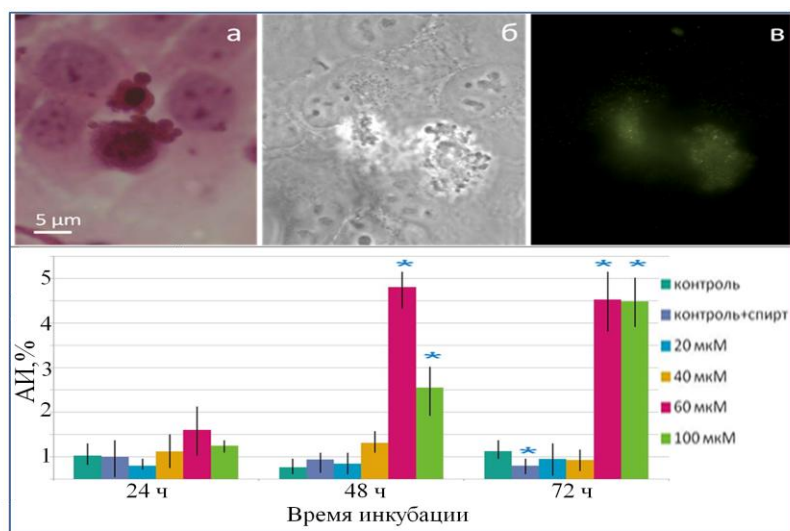


Рис. 9. Апоптоз в клетках HaCaT при действии СВЕ: а –окрашивание гематоксилином и эозином; б- фазовый контраст; в - иммуноцитохимическое выявление каспазы-3 в клетке, показанной на «б», г – зависимость величины AI от концентрации агента и времени воздействия.

Количественная оценка уровня гибели клеток на препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином, показала, что на 2-е и 3-и сутки AI значительно возрастает при концентрациях 60 и 100 мкМ, составляя 4,3% и 2,1% соответственно, но следует отметить, что и в этом случае величина AI остаётся невысокой (рис. 9, гистограмма).

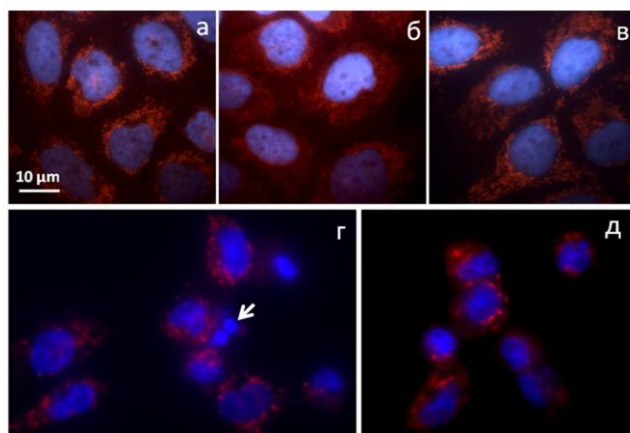
Оценка жизнеспособности клеток HaCaT методом МТТ-теста в целом соответствует

результатам подсчёта AI и так же демонстрирует дозозависимость цитотоксического эффекта СВЕ. Таким образом, клетки линии HaCaT оказываются более устойчивыми к воздействию СВЕ, чем клетки A431.

СВЕ-индуцированный апоптоз в клетках HaCaT происходит по механизму, отличному от митохондриального

Иммуноцитохимическое окрашивание клеток с использованием антител к цитохрому *c* (рис.

Рис. 10.
Иммуноцитохимическое выявление цитохрома *c* в клетках HaCaT: а – контроль, б – контроль с добавлением спирта, в – 40 мкМ СВЕ, 48 ч, г – 60 мкМ СВЕ, 48 ч, д – 100 мкМ СВЕ, 48 ч.



10) показало, что в результате инкубации клеток HaCaT в присутствии 40 мкМ, 60 мкМ, а также 100 мкМ СВЕ не происходит выход цитохрома *c* из митохондрий в цитозоль (рис. 10в,г,д). Кроме того,

полученные результаты демонстрируют отсутствие изменения размера и формы митохондрий. Интересно отметить, что цитохром *c* сохраняется внутри митохондрий даже в клетках с характерными признаками апоптоза, такими как конденсация хроматина и фрагментация ядра (рис. 10г, указано стрелкой).

На ультраструктурном уровне также не было выявлено значительных различий между митохондриями клеток в контроле и при воздействии СВЕ в концентрациях вплоть до концентрации СВЕ 100 мкМ.

СВЕ вызывает повышение уровня АФК в клетках линии HaCaT

Окрашивание клеток с помощью красителя DCFH-DA продемонстрировало значительное увеличение числа окрашенных клеток по сравнению с контрольным уровнем (рис.11). В контроле и в контроле с добавлением этанола уровень АФК невысокий и составляет 0,62% и 0,11%, соответственно. При действии 40 мкМ СВЕ в течение 48 ч доля АФК-положительных клеток возрастает до 6,02%.

Таким образом, в результате инкубации клеток HaCaT с СВЕ в концентрации 40 мкМ в течение 48 ч морфологические изменения митохондрий обнаружены не были, но показано значительное увеличение доли клеток с гиперпродукцией АФК.

Из вышеизложенного можно сделать вывод о том, что, в отличие от клеток эпидермоидной карциномы A431, нормальные кератиноциты HaCaT оказываются более устойчивыми к проапоптотному действию СВЕ, который в данном случае индуцирует гибель клеток при более высоких концентрациях (60 мкМ и выше). Кроме того, СВЕ не вызывает изменения формы и ультраструктуры митохондрий в клетках линии HaCaT, а также не индуцирует выход цитохрома *c* из митохондрий в цитозоль даже в клетках с явными признаками апоптоза; таким образом, апоптоз происходит по механизму, отличному от митохондриального.

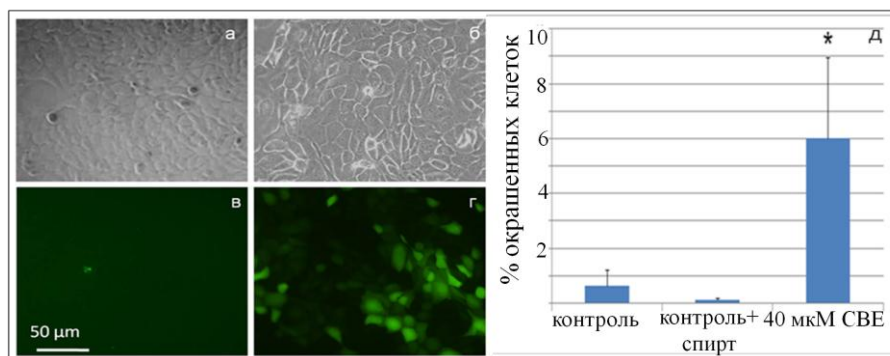


Рис. 11.
Окрашивание
клеток HaCaT с
помощью DHFA:
а, в – контроль,
б, г – 40 мкМ СВЕ,
д – гистограмма.

Реакция компартмента одномембранных органелл на воздействие СВЕ в клетках HaCaT

В целом реакция компартмента одномембранных органелл в линии HaCaT сходна с таковой для A431, но происходит при концентрациях СВЕ 60 и 100 мкМ, в то время как 40 мкМ не вызывает видимых изменений как на световом, так и на ультраструктурном уровне (рис. 12). Так, при концентрации СВЕ величиной 60 и 100 мкМ ЭПР кластеризуется и происходит дилатация канальцев, происходит увеличение содержания везикул в цитоплазме, аппарат Гольджи формирует кластеры, а цистерны его расширяются.

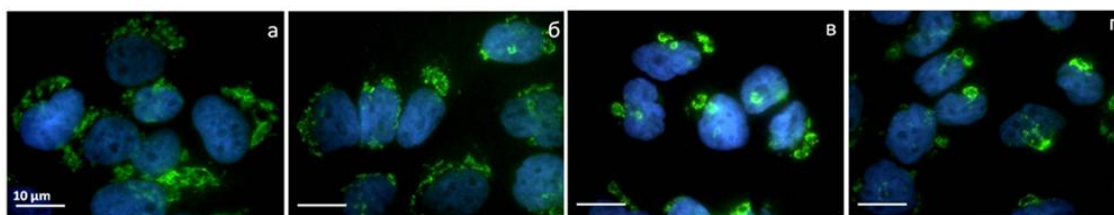


Рис. 12. Иммуноцитохимическое выявление аппарата Гольджи в клетках HaCaT: а – контроль, б – 40 мкМ СВЕ, 48 ч, в – 60 мкМ СВЕ, 48 ч, г – 100 мкМ СВЕ, 48 ч.

СВЕ вызывает изменение морфологии, состояния клеточной поверхности и подвижности клеток HaCaT при более высоких концентрациях, чем требуются для A431

Как и в культуре клеток A431, при действии СВЕ на клетки линии HaCaT было обнаружено изменение их формы и распределения актиновых филаментов. Оно сходно с таковым для A431, но имеет место при более высоких концентрациях (60 и 100 мкМ).

СВЕ в концентрации 40 и даже 60 мкМ не вызывает значительного изменения площади клеток. Заметное уменьшение этого показателя происходит только при воздействии СВЕ в концентрации 100 мкМ (рис. 13ж). Методом СЭМ показано, что СВЕ в концентрациях 60 и 100 мкМ через 48 ч инкубации вызывает сглаживание клеточной поверхности и изменения формы клеток HaCaT, подобные таковым в линии A431 при воздействии 40 мкМ (рис. 13).

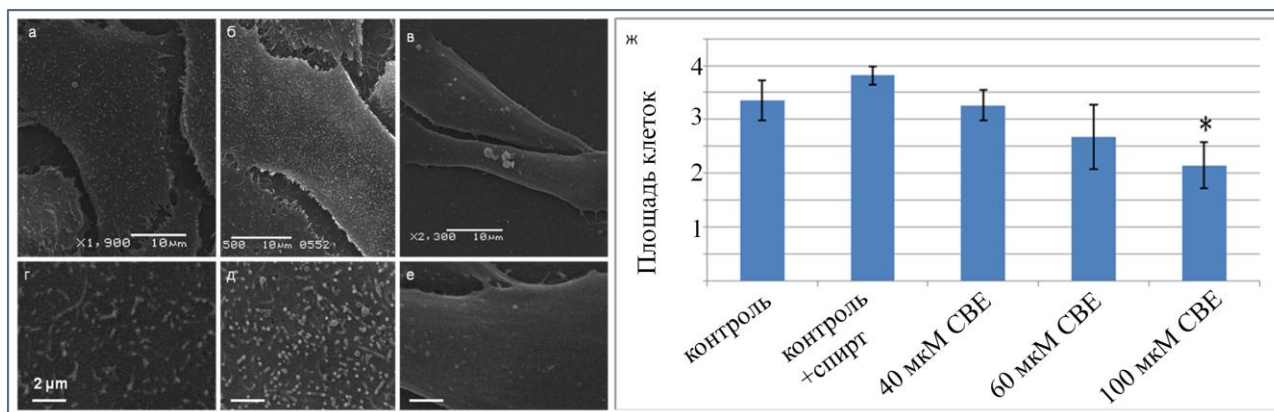


Рис. 13. Культура клеток *NaCaT*. а, б – контроль СЭМ, в, г - 40 мкМ СВЕ, СЭМ, 48 ч., д – 60 мкМ СВЕ, 48 ч, е – 100 мкМ СВЕ, 48 ч, ж – гистограмма площади клеток. Величина площади клеток указана в относительных единицах.

При моделировании раны *in vitro* («скрэтч-тест») в монослойной культуре клеток *NaCaT* показано, что в течение 24 ч стягивание краёв раны происходит практически в равной степени в контроле, контроле с добавлением спирта и при действии 40 мкМ СВЕ. Уменьшение эффективности заживления раны происходит только при действии СВЕ в концентрации 60 мкМ (рис. 14).

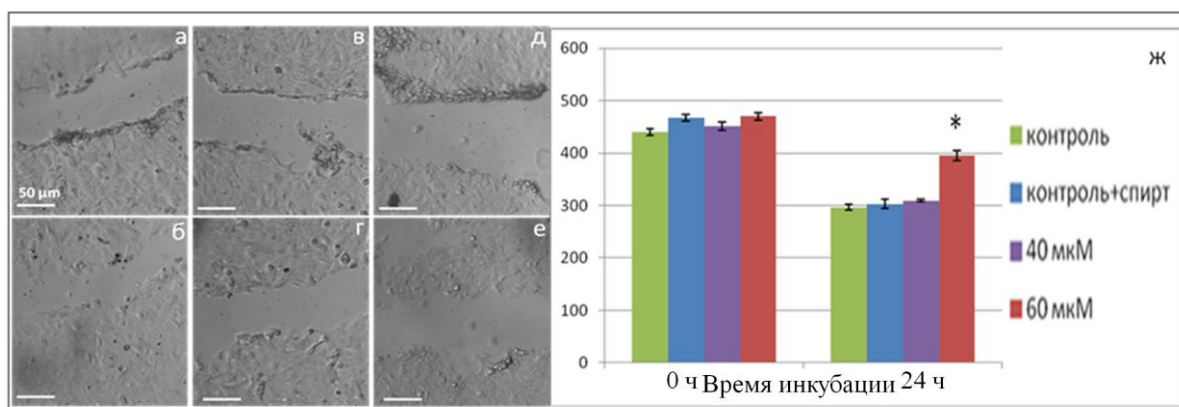


Рис. 14. Модель раны *in vitro* в культуре клеток *NaCaT*: а – контроль, 0 ч, б – контроль, 24 ч, в – 40 мкМ СВЕ, 0 ч, г – 40 мкМ СВЕ, 24 ч., фазово-контрастная микроскопия, д – 60 мкМ СВЕ, 0 ч, е – 60 мкМ СВЕ, 24 ч, ж – гистограмма ширины ран; ширина указана в относительных единицах.

Таким образом, СВЕ в культуре клеток *NaCaT* оказывает влияние на форму клеток, актиновый цитоскелет, состояние клеточной поверхности и подвижность. Наблюдаемые изменения, такие как изменение формы клеток и состояния системы микрофиламентов, сглаживание клеточной поверхности и ингибирование заживления раны *in vitro* сходны с таковыми для A431, но происходят при более высоких концентрациях (60 и 100 мкМ), в то время как СВЕ в концентрации 40 мкМ видимых изменений не вызывает.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе впервые продемонстрировано многообразие эффектов СВЕ по отношению к опухолевым и нормальным клеткам человека, происходящим из многослойного эпителия – клеткам эпидермоидной карциномы A431 и иммортализованным, но не туморогенным кератиноцитам линии HaCaT. Так, показано, что в обеих линиях клеток СВЕ запускает апоптоз, причём эффект зависит от концентрации агента и времени воздействия. Важно отметить, что клетки HaCaT оказываются более устойчивыми к воздействию СВЕ, чем клетки A431. Таким образом, СВЕ обладает селективным цитотоксическим действием по отношению к опухолевым клеткам, что позволяет рассматривать его как потенциальное средство для терапии злокачественных опухолей. С помощью визуализации активных митохондрий, демонстрации выхода цитохрома *c* из митохондрий в цитозоль, а также выявления клеток с гиперпродукцией АФК показано, что в линии A431 апоптоз протекает по митохондриальному пути. Нами впервые были получены данные о воздействии СВЕ на такие компоненты вакуолярной системы, как ЭПР, АГ и лизосомы. Результаты данной работы продемонстрировали неописанное ранее влияние СВЕ на морфологию клеток в целом – было обнаружено изменение формы клеток, состояния актинового цитоскелета а также сглаживание клеточной поверхности. Кроме того, на модели раны *in vitro* показано, что СВЕ подавляет подвижность клеток. В клетках линии HaCaT СВЕ также индуцировал апоптоз, но по механизму, отличному от митохондриального. При исследовании состояния системы одномембранных органелл, формы и подвижности клеток было обнаружено, что вызываемые действием СВЕ изменения очень сходны с таковыми в линии A431, но имеют место при более высоких концентрациях агента. В дальнейшем планируется исследовать митохондриальные молекулярные мишени для СВЕ в клетках A431, определить механизм СВЕ-индуцированного апоптоза клеток HaCaT, исследовать роль одномембранных органелл в гибели нормальных и опухолевых клеток человека и определить механизмы подавления подвижности этих клеток. Подводя итог, можно заключить, что СВЕ представляет собой соединение, обладающее множественными мишенями, а также селективным действием по отношению к злокачественно трансформированным клеткам. Исследование механизмов его действия на опухолевые и нормальные клетки имеет большое значение как для фундаментальной науки, так и для прикладных областей биологии и медицины.

ВЫВОДЫ:

I. В культурах клеток A431 и HaCaT при воздействии СВЕ происходит:

- 1) индукция апоптоза, протекающего в линии A431 по митохондриальному механизму, а в линии HaCaT – по механизму, отличному от митохондриального;
- 2) изменение формы клеток, сопровождающееся уменьшением их площади и реорганизацией актинового цитоскелета;
- 3) подавление подвижности клеток;

4) перераспределение одномембранных органелл (ЭПР, АГ, лизосомы) и изменение их структуры.

П. Реакция клеток на действие СВЕ является дозозависимой и селективной: клетки эпидермоидной карциномы А431 отличаются большей чувствительностью к воздействию агента, чем нормальные кератиноциты HaCaT.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

Статьи в журналах, включённых в перечень ВАК:

1. **Савицкая М.А.**, Вильданова М.С., Кисурина-Евгеньева О.П., Смирнова Е.А., Онищенко Г.Е. Митохондриальный путь апоптоза в клетках эпидермоидной карциномы человека А431 при действии α -токоферилсукцината. // Acta Naturae, 2012, том 4, № 3, с. 93-100;
2. Гаранина А.С., **Савицкая М.А.** Клеточный каннибализм в культуре клеток эпидермоидной карциномы человека А431. Вестник Московского университета. Серия 16: Биология, 2012, № 4, с. 7-9;
3. Вильданова М.С., **Савицкая М.А.**, Онищенко Г.Е., Смирнова Е.А. Действие растительных гормонов на компоненты секреторного пути нормальных и опухолевых клеток человека. Цитология, 2014, том 56, № 7, с. 516-525;
4. **Савицкая М.А.**, Онищенко Г.Е. Механизмы апоптоза. Биохимия, 2015, том 10, выпуск 11, с. 1613-1627;
5. **Савицкая М.А.**, Онищенко Г.Е. Апоптоз при криоконсервации эукариотических клеток. Биохимия, 2016, том 81, № 5, с. 602-611;
6. **Савицкая М.А.**, Онищенко Г.Е. α -токоферилсукцинат влияет на жизнеспособность, пролиферацию и дифференцировку опухолевых клеток. Биохимия, 2016, том 81, № 8, с. 1036-1051.

Тезисы конференций:

1. **Савицкая М.А.** Сравнение воздействия альфа-токоферилсукцината на пролиферацию и гибель культуры эпителиальных трансформированных клеток разного происхождения. Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых Ломоносов-2008. Секция «Биология». Москва, 2008, с. 243-244;
2. **Савицкая М.А.** Исследование механизмов воздействия α -токоферолсукцината на клетки культуры эпидермоидной карциномы человека А431. 13-ая Пущинская Международная школа-конференция молодых учёных «Биология - наука XXI века», г. Пущино, 2009;
3. **Савицкая М.А.** Механизмы гибели клеток эпидермоидной карциномы человека при действии сукцината витамина Е. XXII зимняя молодёжная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии", Москва, Россия, 2010;
4. **Савицкая М.А.**, Кисурина-Евгеньева О.П. Клетки эпидермоидной карциномы человека восстанавливают исходный фенотип после снятия воздействия сукцинатом витамина Е. VIII Всероссийская конференция по патологии клетки, (11-12 ноября, Москва, 2010);
5. **Savitskaya M.A.** Alpha-tocopheryl succinate induces apoptosis via mitochondrial pathway in human carcinoma cells but not normal keratinocytes. International Life Science Students' Conference (November, 10-14, 2010). Netherlands, Nijmegen, 2010;
6. Гаранина А.С., **Савицкая М.А.**, Онищенко Г.Е. Роль цитоскелета в процессе клеточного каннибализма в культуре клеток эпидермоидной карциномы человека А431. Цитология, 2011, серия 9, место издания Санкт-Петербург, том 53, с. 698;

7. **Савицкая М.А.**, Кисурина-Евгеньева О.П., Онищенко Г.Е. α -Tocopheryl succinate induces apoptotic cell death, morphological alterations and inhibits wound-healing in A431 human epidermoid cells. Cell Technology Week-2012, Украина, Киев, 2012;
8. Вильданова М.С., **Савицкая М.А.**, Онищенко Г.Е., Смирнова Е.А. Растительные гормоны повышают уровень экспрессии инволюкрина в эпителиальных нормальных и опухолевых клетках человека. Цитология (II Всероссийская конференция "Внутриклеточная сигнализация, транспорт, цитоскелет", 20-22 октября 2015), том 57, с. 623;
9. **Савицкая М.А.**, Онищенко Г.Е. Сукцинат витамина Е селективно влияет на форму клеток, состояние их цитоскелета и подвижность в культуре клеток эпидермоидной карциномы человека A431, но не нормальных кератиноцитов HaCaT. Сборник научных трудов научной конференции с международным участием "Актуальные вопросы морфогенеза в норме и при патологии" (Москва, 6-7 апреля 2016 г.), Москва, 2016, с. 152-153;
10. **Savitskaya M.A.**, Onishchenko G.E. Selective Action Of Alpha-Tocopheryl Succinate On Normal And Cancer Cell Lines Derived From Human Stratified Epithelium. 2016. 12th International Congress Of Cell Biology (Prague, Czech Republic, July 21-25, 2016). Programme And Abstract Book. 2016, p. 270.