

**Методы детекции апоптоза в клетках сцифоидного полипа *Cassiopea* sp.
(Scyphozoa, Cnidaria)**

Научный руководитель – Косевич Игорь Арнольдович

Бондарь Николай Игоревич

Студент (магистр)

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра зоологии беспозвоночных, Москва, Россия

E-mail: niko13bondar@gmail.com

Апоптоз является одним из вариантов программируемой клеточной гибели, который приводит к уменьшению размера клетки, конденсации и фрагментации хроматина, уплотнению ядерной и цитоплазматической мембран без выхода содержимого клетки в окружающую среду. Этот процесс играет важную роль в эмбриональном развитии и бесполом размножении беспозвоночных животных. Анализ процесса апоптоза обычно проводится на уровне клеточных популяций, с использованием различных методов микроскопии, проточной цитометрии и иммуноблоттинга. В литературе практически отсутствуют методики для описания апоптотических процессов в отдельных клетках беспозвоночных с указанием локализации клеток в теле животного и стадии клеточной гибели.

В экспериментах на тканях *Cassiopea* sp. была отработана методика индукции и описания процессов программируемой клеточной гибели. Животных анестезировали 3,5% раствором $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, апоптоз индуцировали с помощью теплового шока при температуре 37 [U+2103] в течение 20 минут. Ткани животного окрашивали витальными красителями Hoechst (для детекции ядер), CellEvent (для детекции активных каспаз 3/7) и PI (для детекции мертвых клеток) и исследовали на микроскопе Nikon Eclipse T12 в трех каналах флуоресценции. При окрашивании живых клеток *Cassiopea* sp. основной проблемой стала сильная автофлуоресценция в каналах, соответствующих FITC и DAPI, что было устранено выдерживанием животных в темноте и без еды в течение недели. Было показано, что наличие $MgCl_2$ не меняет соотношение апоптотических и некротических клеток. Также на соотношение процессов некроза и апоптоза не влияет диссоциация тканей на отдельные клетки.

Окрашивание клеток *Cassiopea* sp. тройной меткой позволило выявить все популяции клеток на различных стадиях клеточной гибели. Клетки с ярко окрашенным ядром и отсутствием свечения в цитоплазме были живыми клетками, клетки со слабым свечением CellEvent в цитоплазме были идентифицированы как клетки на ранних стадиях апоптоза. Клетки со свечением CellEvent как в цитоплазме, так и в ядре были клетками на поздних стадиях клеточной гибели (ядерная мембрана становится проницаемой). Соотношение клеток на различных стадиях апоптоза составило: 3,25% — клетки, в составе которых окрашены только реагентом PI; 27,8% — клетки, на терминальных стадиях апоптоза, имеющие окрашивание реагентами PI и CellEvent; 68,95% — функционирующие клетки, имеющие окрашивание только реагентом DAPI. Клетки, положительные по CellEvent и PI были описаны как клетки в терминальных стадиях апоптоза и клетки, положительные только по PI были охарактеризованы как популяция некротических клеток.

С помощью методов проточной цитометрии и флуоресцентной микроскопии мы также показали, что витальная окраска TMRE в качестве суррогатного маркера пермеабильности митохондрий может быть использована для описания обратимости процессов апоптоза, однако не может быть использована в качестве четвертой метки вследствие перекрытия спектров флуоресценции с пропидий иодидом.

Таким образом, окраска тканей *Cassiopea sp.* с использованием четырех витальных красителей и индукция апоптоза с помощью непродолжительного теплового шока может быть использована в качестве модели для описания процессов клеточной гибели в клетках беспозвоночных. Данный метод применим только при предварительном выдерживании объектов без питания.