

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЙ И РЕНТГЕНСПЕКТРАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ КЛЕТОК U-937 В ПРОЦЕССЕ АПОПТОЗА, ИНДУЦИРОВАННОГО ГИПЕРТОНИЕЙ

© Е. С. Снизиревская,¹ А. В. Мошков,¹ В. Е. Юринская,¹
А. А. Веренинов,¹ Я. Ю. Комиссарчик^{1, 2, *}

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург,
и ²С.-Петербургский государственный университет;
* электронный адрес: yukomis@incras.ru

Результаты настоящей работы, касающиеся ультраструктурных изменений клеток U-937, находящихся в состоянии апоптоза, в большой степени согласуются с аналогичными сведениями, имеющимися в литературе. Вместе с тем получены оригинальные данные по ультраструктурным изменениям клеточных органелл и иммуноцитохимической локализации и распределению протеасом. Продемонстрировано, что при индукции апоптоза, вызванного инкубацией клеток в гипертоническом растворе сахарозы (200—400 мМ), аппарат Гольджи (АГ) локализуется вплотную к плазматической мембране клеток. Этот факт является косвенным свидетельством деполимеризации элементов цитоскелета уже на начальных этапах апоптоза, в частности микротрубочек, удерживающих АГ в центре клетки. На более поздних стадиях апоптоза значительное увеличение расстояний между отдельными цистернами АГ определяется, по-видимому, расщеплением связывающих их белков гольджинов. Митохондрии в апоптотических клетках существенно не изменяются. Они имеют регулярно расположенные кристы и довольно плотный матрикс, содержащий отдельные вакуоли.

На всех стадиях апоптоза в ядре и цитоплазме клеток U-937 обнаружены протеасомы, представленные мелкими палочковидными осмиофильными частицами размером около 12×30 нм. Частицы формируют агрегаты разных плотности и размеров, не ограниченные мембраной. Предполагается, что они аналогичны описанным в литературе «processing bodies», или агрегатам, которые выявляются в клетках в условиях подавленных транскрипционных процессов в ядре и, по мнению ряда исследователей, выполняют функцию запасаения и деградации различных мРНК, РНП и белков. Рентгеноспектральный анализ выявил изменения внутриклеточного содержания Na⁺ и K⁺ на уровне единичной клетки в процессе апоптоза, вызванного осмотическим шоком. Продемонстрировано увеличенное отношение внутриклеточного содержания Na⁺/K⁺ по сравнению с контролем для большинства клеток, находящихся в апоптозе.

Ключевые слова: клетки U-937, апоптотические тела, конденсация хроматина, протеасомы, микротрубочки, аппарат Гольджи, рентгеновский микроанализ, иммуноцитохимия.

Принятые сокращения: АГ — аппарат Гольджи, ЭР — эндоплазматический ретикулум, СМ — световая микроскопия, ЭМ — электронная микроскопия, РМА — рентгеновский микроанализ.

Явление локальной физиологической смерти клеток в ходе эмбриогенеза и метаморфоза у Metazoa было отмечено на гистологическом уровне уже в середине XIX столетия такими известными учеными, как Фогт, Вейсман и Флеминг (см. обзор: Maghsoudi et al., 2012). В последующие годы электронно-микроскопические и биохимические методы исследования внесли большой вклад в понимание «программируемой» смерти клеток, к которой в 1972 г. английскими исследователями был применен термин «апоптоз» (Kerr et al., 1972).

Роль апоптоза чрезвычайно важна не только в период эмбрионального развития, но и для поддержания тканевого гомеостаза взрослого организма и нормального функционирования всех систем органов, в частности иммунной системы. Нарушения процессов апоптоза могут привести к патологическим изменениям организма. Так, уменьшение элиминации трансформированных клеток

путем апоптоза может привести к развитию злокачественных опухолей (Cotter, 2009; Portt et al., 2011), в то время как активизация апоптоза приводит к нейродегенеративным и аутоиммунным заболеваниям (Favaloro, 2012). В последние годы появились новые разработки в области антираковой терапии, связанные с возможностью стимуляции или ингибирования протеасом, которые, по современным представлениям, играют существенную роль в регуляции апоптоза (Glickman, Ciechanover, 2002; Portt et al., 2011).

Изучение апоптоза в ткани *in situ* представляет большие трудности из-за редкой встречаемости апоптотических клеток в нормально функционирующей ткани (Saraste, Pulkki, 2000). Поэтому, как и для многих других целей, клеточные культуры имеют ряд преимуществ перед клетками тканей при исследовании динамики и структурной организации апоптотических клеток. Очень важно, что апоп-

тоз в клеточной культуре можно индуцировать с помощью воздействия различных агентов. Поэтому клетки культуры представляют собой удобную модель для изучения процессов «угасания» клеточных функций. Особый интерес представляет параллельное исследование функциональных и морфологических изменений клеток в культуре, свидетельствующих о нарушениях в клетках ионного гомеостаза, структурных перестройках внутриклеточных органелл: митохондрий, эндоплазматического ретикулума (ЭР), аппарата Гольджи (АГ), элементов цитоскелета и убиквитин-протеасомных комплексов.

Среди классических характеристик, определяющих вхождение клетки в апоптоз, является сокращение ее объема (apoptotic volume decrease — AVD) (Kerr et al., 1972; Wyllie, 1980; Benson et al., 1996). Изменение клеточного объема является результатом изменений ионного гомеостаза, в особенности в связи с перемещением ионов Na^+ и K^+ (Offen et al., 1995; Широкова, 2007; Bortner, Cidlowski, 2007). Имеются неоспоримые данные, указывающие на то, что на ранних стадиях апоптоза происходит увеличение концентрации внутриклеточного Na^+ вслед за уменьшением внутриклеточных Na^+ и K^+ (Arrebola et al., 2005). Эти результаты говорят о важной регуляторной роли катионов Na^+ и K^+ как в период начального сигналинга, так и во время исполнительной фазы апоптоза.

Показано, что апоптоз в клетке индуцируется как внешними, так и внутренними стимулами (Samm et al., 2011). При этом апоптоз может развиваться по разным путям: каспазорецепторному, каспазомитохондриальному и каспазозависимому (Saraste, Pulkki, 2000; Arden, Betenbaugh, 2004; Samm et al., 2011). Классические морфологические исследования, к сожалению, трудно согласовать с имеющимися биохимическими и физиологическими данными, касающимися сигнальных каскадов этого сложного процесса. Наиболее адекватным подходом является иммуноцитохимический анализ локализации определенных компонентов, участвующих в апоптозе. Однако морфологические знания необходимы, чтобы понять, на каком этапе апоптоза встречаются те или иные участники данного сигнального пути.

Настоящая работа посвящена исследованию ультраструктурных перестроек клеток гистиоцитарной лимфомы U-937 при вхождении их в состояние апоптоза, иммунолокализации и распределения протеасом, а также изменений содержания Na^+ и K^+ на уровне единичной клетки. Апоптоз клеток U-937 индуцировали гипертоническим шоком, который по своему действию аналогичен действию таких распространенных индукторов апоптоза, как стауроспорин, эпопозид, дексаметазон и др. (Юринская и др., 2011; Yurinskaya et al., 2012).

Материал и методика

Исследование проводили на культуре клеток гистиоцитарной лимфомы U-937, полученной из Российской коллекции клеточных культур Института цитологии РАН (Санкт-Петербург). Концентрированную суспензию клеток наносили на непрерывный изосмотический градиент Перколла. Апоптоз исследованных клеток вызывали гипертонией посредством добавления сахарозы в различной концентрации (200, 300 или 400 мМ) в культуральную среду при комнатной температуре. После 2—4-часового пребывания в этом растворе клетки четко разделялись в градиенте Перколла на две субпопуля-

ции — легкую и тяжелую (Юринская и др., 2011; Yurinskaya et al., 2012). Для электронно-микроскопического и рентгеноспектрального анализа клетки из каждой фракции отбирали шприцем и обрабатывали по соответствующим методикам.

Для светооптического исследования использовали тот же материал, что и для целей электронной микроскопии (ЭМ). Из материала, залитого в эпоксидную смолу, с помощью ультрамикротомы LKB-III приготавливали полутонкие срезы и окрашивали их раствором толуидинового синего. Просмотр срезов осуществляли в световом микроскопе Pascal, используя объектив 40 \times . Измерение размеров клеток (большой диаметр) и статистическую обработку проводили с помощью компьютерной программы Image Tool.

Для ультраструктурного анализа материала (ЭМ) и приготовления ультратонких срезов клетки U-937 фиксировали 2.5%-ным раствором глутаральдегида в 0.05 М фосфатном буфере (pH 7.4) в течение 30—40 мин при комнатной температуре с последующей постфиксацией в 1%-ном растворе OsO_4 в том же буфере. Материал дегидратировали с помощью этилового спирта восходящей концентрации (до 96 %) и абсолютного ацетона и заливали в Эпон—Аралдиг (Миронов и др., 1994). Ультратонкие срезы контрастировали раствором уранил-ацетата на 40%-ном этиловом спирте и цитратом свинца. Объекты просматривали в электронном микроскопе Libga-120.

Иммуноцитохимический анализ проводили на срезах клеток, залитых в акриловую смолу LR-White. Объекты фиксировали в растворе, содержащем 2 % формальдегида и 0.1 % глутаральдегида в 0.05 М фосфатном буфере (pH 7.4), в течение 30—40 мин при комнатной температуре. Дегидратацию и пропитку материала проводили также при комнатной температуре, а полимеризацию смолы — при 52—54 °С. Ультратонкие срезы монтировали на никелевые сеточки, которые помещали на каплю соответствующего реагента в ходе иммуноцитохимической обработки материала. Поликлональные антитела к субъединице $\alpha 7$ протеасомного белкового комплекса получены в Институте цитологии РАН (Livinskaya et al., 2001). Для исключения неспецифического связывания антител срезы сначала инкубировали в 1 %-ном растворе бычьего сывороточного альбумина в фосфатном солевом буферном растворе, pH 7.4 (PBS, Sigma), в течение 20 мин. Затем срезы в течение 1 ч выдерживали на капле поликлональных антител к субъединице $\alpha 7$ протеасом, разведенных в 100 раз PBS, содержащим 0.1 % бычьего сывороточного альбумина, после чего многократно промывали 0.05 %-ным раствором Твина-20 в PBS. После этого срезы инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре в растворе протеина А, конъюгированного с коллоидным золотом (10 нм, Polyscience, США), заменяющего вторые антитела, промывали 0.05%-ным раствором Твина-20 в PBS. Контролем служили срезы, не обработанные антителами к изучаемым белкам (Миронов и др., 1994). Срезы контрастировали уранил-ацетатом и цитратом свинца и просматривали в электронном микроскопе Libra-120.

Рентгеновский микроанализ (РМА) элементного состава исследованных клеток потребовал разработки и усовершенствования метода препарирования исследуемых нами клеток, позволяющего сохранить нативное распределение ионов. Наши ранние исследования и данные литературы указывают на то, что рутинные элект-

ронно-микроскопические методы препарирования (химическая фиксация, дегидратация и заливка в эпоксидные смолы), которые использовались рядом исследователей для РМА, драматически нарушают нативное распределение ионов. Особенно это касается быстро диффундирующих ионов, каковыми являются катионы Na^+ и K^+ . Наиболее адекватным способом препарирования биологических объектов для РМА являются их быстрое замораживание и последующий анализ в электронном микроскопе в гидратированном состоянии. При отсутствии низкотемпературного держателя объектов в рентгеновском спектрометре и приспособлений для переноса замороженных объектов непосредственно в электронный микроскоп используют другой, достаточно эффективный и адекватный метод: быстрое замораживание с последующей сублимацией витрифицированной воды в высоком вакууме при температуре объектов не выше -80°C . Большинство исследований элементного состава клеток методом РМА, опубликованных в последние годы, выполнено в основном этим методом. Мы тоже использован этот метод. Для этой цели нами была собрана вакуумная установка, позволяющая производить откачку витрифицированной воды из замороженных в пропане, охлажденном жидким азотом, клеток в вакууме 10^{-6} мм рт. ст. Изменяемые температуры объектов в процессе откачки находились в пределах от -196 до 20°C . Вкратце, препарирование объектов состоит из следующих этапов: быстрое замораживание клеток в пропане при -196°C ; перенос клеток в вакуумную установку, предметный столик которой охлажден до -80°C ; откачка витрифицированной воды при этой температуре в течение 3—5 ч; постепенное повышение температуры до комнатной в течение последующих 4—5 ч. Таким образом, вся процедура извлечения воды из объекта занимает 7—10 ч. Анализ элементного состава исследованных клеток проводили на электронном микроскопе Libra-120, снабженном рентгеновским энергетическим дисперсионным детектором INCA Energy (Oxford Instrument, Oxford, Великобритания). Анализ проводили при стационарном электронном пучке диаметром 20 нм при токе 6 мА и напряжении 40 и 80 кВ. Время набора импульсов составляло 300 с. Каждую клетку анализировали 1 раз. Размеры участков сканирования в эксперименте и контроле были равными.

Результаты

Световая микроскопия. С помощью светового микроскопа сравнивали морфологию клеток гистиоцитарной лимфомы человека U-937 в контроле и при апоптозе, индуцированном инкубацией клеток в гипертоническом растворе сахарозы (200—400 мМ) в течение 2 ч (рис. 1, а, в, д). Клетки U-937 в контроле выглядят практически как обычные лимфоциты — округлые, с многочисленными микроворсинками на поверхности. В контрольной популяции встречаются клетки в состоянии митоза. Ядра довольно крупные, часто лопастные, содержат одно или два ядрышка. Гипертонический раствор сахарозы изменяет морфологию и размеры клеток. Компьютерная программа Image Tool показала, что средний размер (диаметр) контрольных клеток составляет 10.7 ± 1.03 мкм. Клетки легкой фракции имели в среднем несколько большие размеры — 11.5 ± 1.2 мкм. Часть клеток полностью лишена микроворсинок. Встречаются клетки с отделяющимися апоптозными телами. Клетки

тяжелой фракции отличались от контрольных и клеток легкой фракции неправильной формой, зачастую вытянутой, часто с отделяющимися апоптозными телами. Цитоплазма клеток и их ядра существенно уплотнились. Диаметр клеток тяжелой фракции составлял 7.7 ± 1.2 мкм.

Ультраструктура клеток U-937. Контрольные клетки представляют собой довольно однородную популяцию с характерной для лимфоцитов в культуре морфологией, выявляемой в электронном микроскопе. Клетки имеют форму, близкую к округлой, их поверхность покрыта микроворсинками (рис. 1, б; 2, а, б). Цитоплазма имеет среднюю электронную плотность и содержит все присущие клеткам внутриклеточные органеллы. Ядра немного смещены к одной из сторон клеток. Иногда они имеют неправильную лопастную форму. В ядрах содержатся 1—2 ядрышка в срезе и гетерохроматин, который выявляется вдоль ядерной оболочки. АГ клеток U-937 хорошо развит, имеет в своем составе 4—5 параллельных, слегка расширенных цистерн. Часто АГ локализуется между лопастями ядра (рис. 2, б). Цистерны шероховатой эндоплазматической сети занимают в основном периферическую часть клеток. В цитоплазме встречаются отдельные микротрубочки и актиновые филаменты. Довольно хорошо развит кортикальный слой примембранного актина, в частности внутри микроворсинок. Митохондрии часто располагаются группами по 3—4 органеллы. Обращает на себя внимание, что некоторая часть митохондрий находится в набухом состоянии.

Ультраструктура клеток U-937, обработанных гипертоническим раствором сахарозы (апоптоз). Гипертонический раствор сахарозы изменяет морфологию клеток. Они приобретают морфологические особенности, характерные для апоптозных клеток, описанные в литературе. В наших экспериментах измененные клетки разделялись в градиенте плотности Перколла на две популяции — легкую (верхнюю) и тяжелую (нижнюю). На ультратонких срезах видно, что в легкой фракции преобладают светлые клетки, тогда как во второй, тяжелой, фракции больше темных клеток (рис. 1, з, е). Светлые клетки, на поверхности которых содержится небольшое количество микроворсинок, более крупные (в среднем 11.5 мкм), имеют более прозрачную цитоплазму, по плотности приближающуюся к цитоплазме нормальных клеток. Вместе с тем в отличие от контрольных клеток в них появляются фрагменты цитоплазмы и ядер, окруженные мембранами, представляющие собой один из ранних этапов формирования апоптозных тел, не видимые в световом микроскопе (рис. 1, з; 2, а). Темные клетки мельче (в среднем 7.7 мкм), их поверхность практически лишена микроворсинок, они имеют более плотную цитоплазму и конденсированный ядерный хроматин, в основном сконцентрированный на одной из сторон ядра (рис. 1, е).

Темные клетки рассматриваются в литературе как клетки, находящиеся на терминальной стадии апоптоза. В них уплотняются ядра и цитоплазма, в избытке обнаруживаются апоптозные тела (рис. 3, б). Если в светлых клетках апоптозные тела содержат клеточные органеллы (ЭР, митохондрии и рибосомы), то в клетках с плотной цитоплазмой органеллы не выявляются ни в апоптозных телах, ни в цитоплазме клеток. Характерно, что апоптозные тела отделяются, как правило, полярно, на одной из клеточных сторон. Сама клетка приобретает вытянутую форму. Возможно, эти изменения формы клеток связаны с перестройкой актинового цитоскелета, хотя проследить

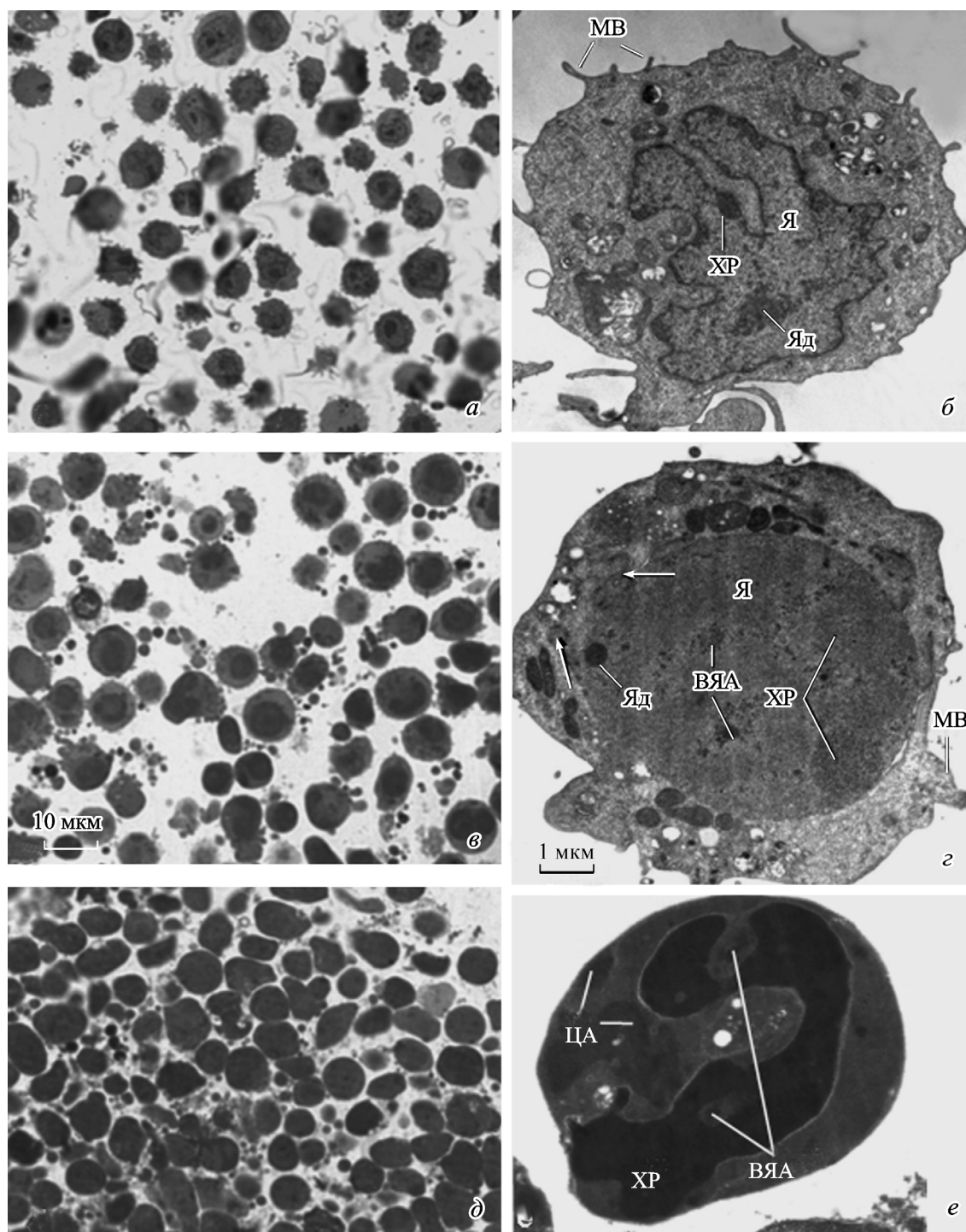


Рис. 1. Светооптические (левая колонка) и электронно-микроскопические (правая колонка) изображения клеток U-937.

a, б — контрольные клетки; поверхность клеток покрыта микроворсинками (МВ), в ядре (Я) видны ядрышко (Яд) и гетерохроматин (ХР), *в, з* — светлые клетки легкой фракции, находящиеся в начальной стадии апоптоза; на их поверхности имеются отдельные микроворсинки (МВ), появляются внутриядерные (ВЯА) и цитоплазматические (ЦА) агрегаты частиц. *д, е* — темные апоптотные клетки; по мере развития апоптоза заметны уменьшенные размеры клеток и усиление конденсации хроматина.

это, к сожалению, нам не удалось. Затем клетка буквально распадается на отдельные фрагменты, представляющие собой апоптотные тела. В тканях апоптотные тела фагоцитируются макрофагами, а в культуре клеток они накапливаются.

Начиная с ранних этапов апоптоза встречаются картины фрагментации ядер. На одном сечении через центр клет-

ки можно увидеть до 6—8 фрагментов ядер с конденсированным хроматином, располагающимся на одной стороне ядра, так называемое серповидное распределение хроматина (рис. 3, *в*). Иногда наблюдается отпочковывание апоптотного тела, содержащего фрагмент ядра (рис. 3, *з*).

Интересные данные мы получили по изменению структуры АГ. На начальных этапах апоптоза в светлых

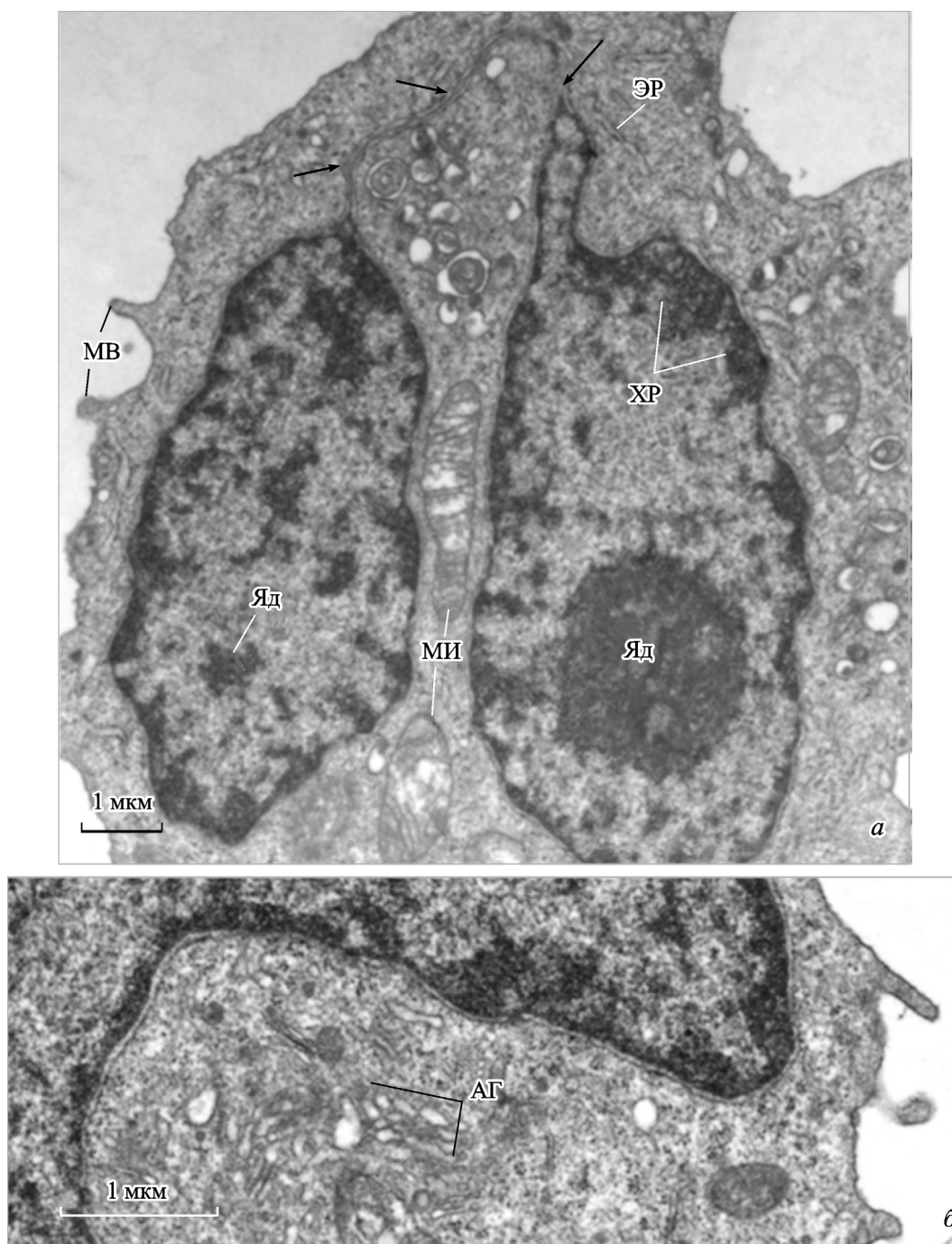


Рис. 2. Участки контрольных клеток U-937. Электронная микроскопия.

а — в клетке видно большое ядро, состоящее из двух лопастей, соединенных тонким мостиком (стрелки); гетерохроматин (ХР) распределен вдоль оболочки ядра, в каждой части ядра локализуется ядрышко (Яд); митохондрии (МИ) часто содержат вакуолеподобные набухания, по периферии цитоплазмы встречаются цистерны ЭР; МВ — микроворсинки. *б* — обширная зона АГ располагается вблизи ядра.

клетках АГ в основном локализуется на периферии клетки, что, возможно, связано с потерей связей цистерн с микротрубочками, в результате чего АГ мигрирует к плазматической мембране. Позже цистерны АГ сильно набухают и на терминальных стадиях развития апоптоза теряют связь друг с другом (рис. 3, *д*, *е*).

При прогрессии апоптоза на фоне деградации большинства клеточных органелл наименьшие изменения наблюдаются в митохондриях, несмотря на то что они считаются наиболее чувствительными индикаторами плохого

состояния клеток. Наряду с вакуолизированными митохондриями в апоптотических клетках встречаются крупные митохондрии с регулярно расположенными кристами, практически без набуханий (рис. 3, *ж*). Подобные митохондрии видны и в апоптотических телах, отделяющихся от светлых клеток. В темных клетках матрикс митондрий уплотняется, и кристы зачастую выявляются как негативно окрашенные мембраны.

Большое значение мы придаем тому, что на всех стадиях апоптоза в ядре и цитоплазме и светлых, и темных

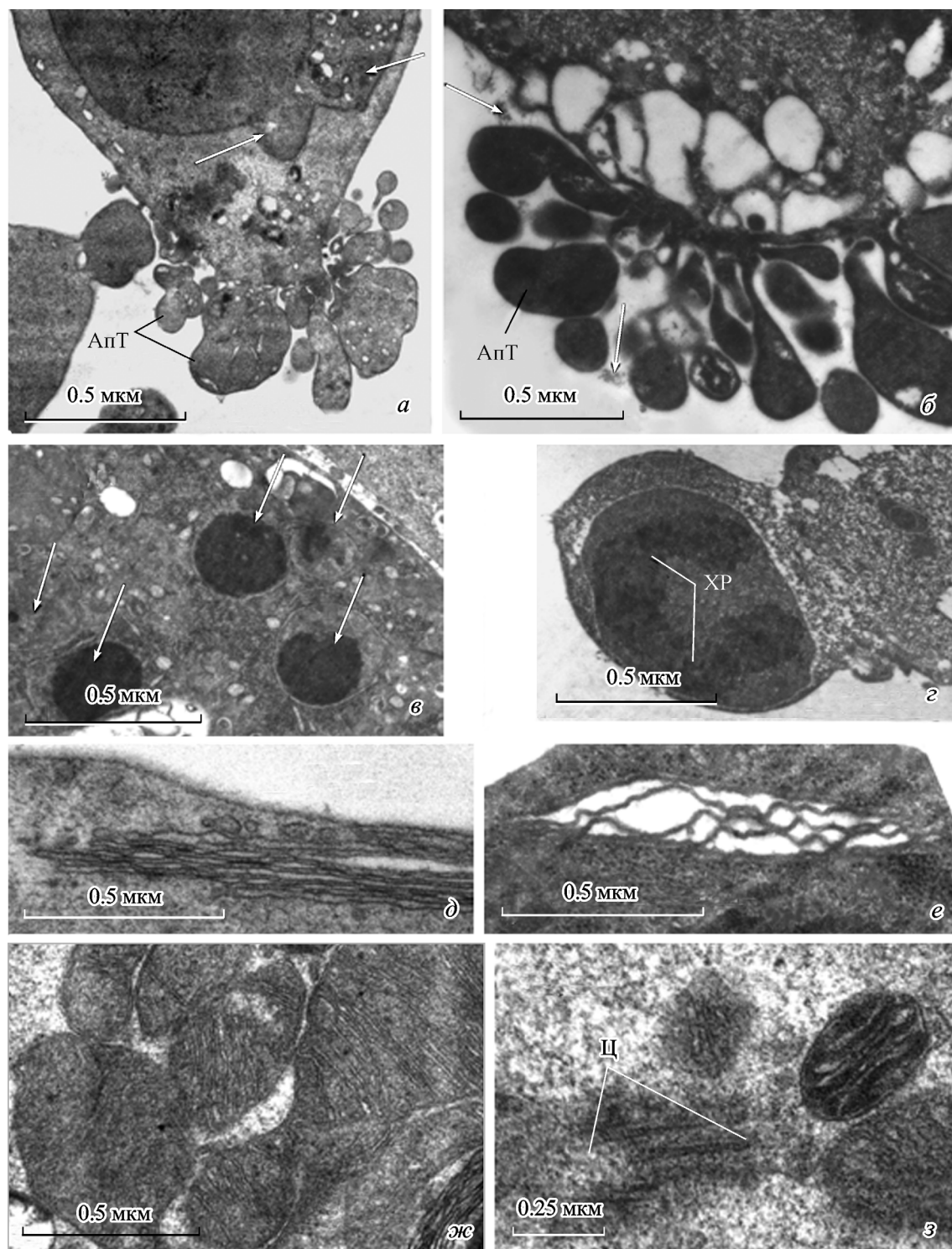


Рис. 3. Участки светлых (левая колонка) и темных (правая колонка) апоптотических клеток.

а, б — формирование апоптотических тел (АпТ) на одном из концов клеток; в светлой клетке цитоплазма содержит внутриклеточные органеллы, в темной — цитоплазма сильно уплотнена, *стрелками* указаны экстрадирующиеся из клетки протеасомы. *в* — апоптотическая клетка с 5 фрагментами ядра (*стрелки*), содержащими конденсированный хроматин. *г* — отпочковывание ядра вместе с АпТ. *д, е* — перестройка АГ: в результате миграции органелла оказывается на периферии клетки (*д*), *ж* — часть апоптотических клеток содержит крупные митохондрии с регулярно расположенными кристами и темным матриксом. *з* — на всех стадиях, за исключением терминальной, встречаются центриолы (Ц), не связанные с агрегатами цитоплазматических протеасом.

клеток встречаются довольно большие агрегаты частиц разной формы и размеров (рис. 4, *а—е*). Часть из них представлена внутриядерными кластерами интерхроматиновых гранул, имеющих крупные (24×50 нм) размеры (рис. 4, *б*), часть агрегатов содержит палочковидные

осмиофильные частицы значительно меньших размеров (12×30 нм), которые мы интерпретируем как протеасомы (рис. 4, *в—е*). Агрегаты, не ограниченные мембраной, имеют разные плотности и размеры (до 1 мкм в диаметре). В некоторых случаях наряду с протеасомами они со-

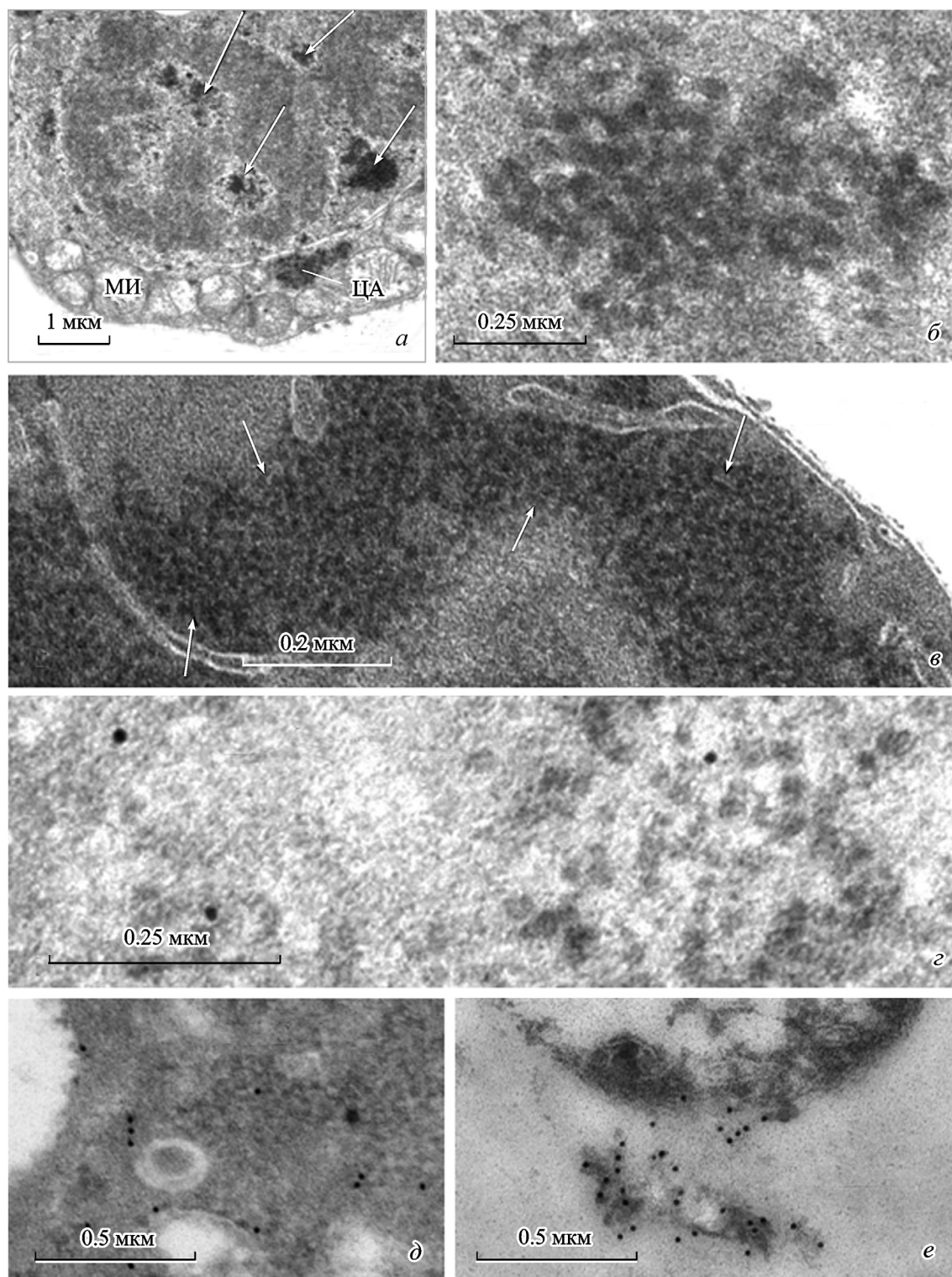


Рис. 4. Агрегаты частиц, встречающиеся в апоптотных клетках.

а — в светлых клетках появляются агрегаты внутриядерных (*стрелки*) и цитоплазматических частиц (ЦА). *б* — интерхроматиновые гранулы размером 24×50 нм. *в* — агрегат частиц в цитоплазме и апоптотном теле; видны мелкие палочковидные частицы — протеасомы — размером $(10-12) \times (25-30)$ нм (*стрелки*); заливка в LR-White, мембраны окрашены негативно. *г* — рыхлый агрегат мелких палочковидных частиц в ядре, меченных антителами к субъединице протеасомного белка α 7 (размер частиц коллоидного золота 10 нм); размеры протеасом 12×30 нм. *д* — участок цитоплазмы, содержащий протеасомы, меченные коллоидным золотом. *е* — интенсивное мечение выделяющихся из клетки протеасом; видны частицы коллоидного золота (10 нм).

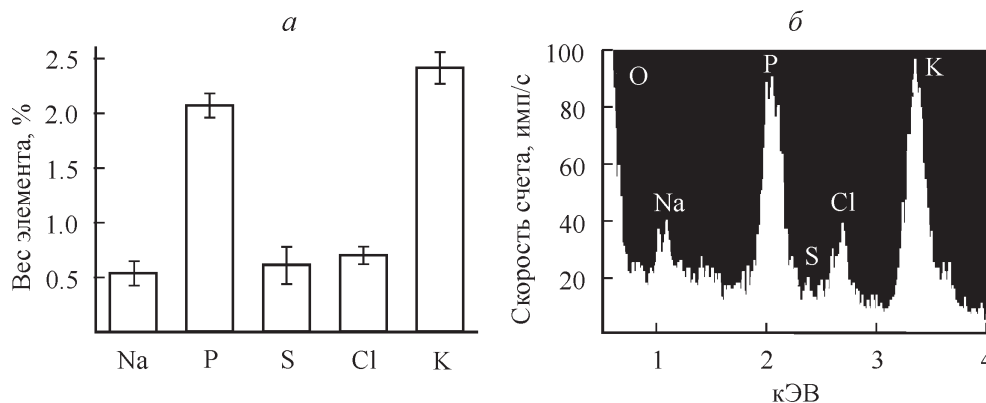


Рис. 5. Элементный состав контрольных клеток U-937. Содержание элементов выражено в весовых процентах.

a — гистограмма построена на основании рентгеновских спектров 5 клеток; соотношение Na/K составляет 0.2; спектры набирали при 80 кВ в течение 300 с. *б* — рентгеновский спектр одиночной клетки.

держат бесструктурный осмиофильный материал. Хотя мы не видим прямой связи материала ядерных и цитоплазматических агрегатов, на некоторых микрофотографиях можно наблюдать агрегаты частиц ядра и цитоплазмы вблизи одного и того же участка ядерной мембраны (рис. 4, *a*). При формировании апоптотических тел агрегаты, так же как и другие внутриклеточные органеллы, оказываются в их составе.

Можно думать, что наблюдаемые в ядре и цитоплазме агрегаты частиц представляют собой один из вариантов гранул, не ограниченных мембраной, появляющихся в клетках при воздействии стресса и индукции апоптоза, выполняющих в клетках функцию процессинга и элиминации ненужных или неправильно свернутых белков. Скорее всего, наблюдаемые агрегаты частиц можно отнести к типу так называемых Р-телец (processing bodies — PB), или агресом.

На строго продольных срезах отдельных протеасом видна их периодическая структура, определяемая чередованием светлых и темных полос с периодом повторения порядка 10 нм (рис. 4, *в*, *з*). Размеры этих структур превышают размеры выделенных и негативно окрашенных протеасом, описанных в литературе, что, возможно, связано с сохранением их состояния, более близкого к нативному, чем после выделения (Zoeger et al., 2006). Их толщина составляет 10—12, длина — 25—30 нм, тогда как по данным Зегера с коллегами — 10×15 нм. По всей вероятности, протеасомы, выявляющиеся на наших срезах, являются протеасомными комплексами 26S, тогда как Зегер с соавторами исследовали протеасомы 20S (Zoeger et al., 2006).

Наряду с отделением от клеток апоптотических тел во внешнюю среду выделяются из клеток агрегаты бесструктурных палочковидных частиц с размерами, близкими к размерам протеасом (15×40 нм) (рис. 3, *б*; 4, *e*). По всей вероятности, эти частицы также представляют собой протеасомы, но в другом функциональном состоянии. Возможно, выделяющиеся во внеклеточное пространство протеасомы не связаны с перерабатываемыми ими белками и убиквитином и поэтому легче разрушаются при подготовке образца для ЭМ. Общим свойством этих структур как внутри, так и снаружи клетки является их агрегация.

Иммунная ЭМ. Для идентификации протеасом в клетках U-937 был проведен иммуноцитохимический анализ белков протеасом в электронном микроскопе. Для

этого была проведена непрямая иммуноцитохимическая реакция с использованием коллоидного золота. В качестве первых антител использовали поликлональные антитела к одной из субъединиц структурных белков протеасом — $\alpha 7$.

Оказалось, что зоны в ядре и цитоплазме клеток U-937, содержащие протеасомы, метятся антителами против субъединицы протеасом $\alpha 7$, хотя и с небольшой интенсивностью (рис. 4, *в*—*д*). Однако специфичность этой реакции и отсутствие реакции в контроле говорят о протеасомной природе этих структур. Более интенсивная метка наблюдается на протеасомах, экструзирующихся из клеток (рис. 4, *e*). Возможно, это связано с конформационными изменениями протеасомных субъединиц в процессе их экстрюзии из клеток, в результате чего детерминанты связывания антигена с АТ к субъединице $\alpha 7$ могли стать для них более доступными.

РМА. Сравнительное изучение содержания Na^+ и K^+ при апоптозе указывает на существенный разброс содержания исследованных элементов как в контрольных клетках, так и в апоптотических. Следует указать, что в настоящей работе мы не ставили перед собой задачу оценить абсолютные концентрации элементов. Содержание элементов выражали в весовых процентах. За 100 % принимали суммарное содержание С, О, Na, P, S, Cl и K.

На рис. 5 видно, что рентгеновские спектры контрольных клеток характеризуются низким содержанием Na и высоким — K, в то время как в апоптотических клетках наблюдается обратная картина содержания этих ионов (рис. 6). Необходимо еще отметить, что содержание фосфора практически не изменялось, а Cl, как правило, в апоптотических клетках оказывалось меньше. Но мы в основном ограничились оценкой соотношения содержания Na/K. В контроле это соотношение находилось в пределах от 0.22 до 0.36, в то время как в апоптотических клетках — от 0.5 до 2.0. Такой разброс как в контроле, так и в эксперименте вполне ожидаем, в связи с тем что различные клетки культуры, по-видимому, находятся в разном физиологическом состоянии, и соответственно индукция апоптоза различных клеток в большей степени асинхронна.

Мы анализировали подвергнутые гипертоническому шоку клетки, разделенные в градиенте плотности Перколлы, на две фракции — легкую и тяжелую. По данным световой микроскопии, эти фракции обладали различным количеством апоптотических клеток — в тяжелой фракции их было значительно больше. Мы проводили рентгеноспект-

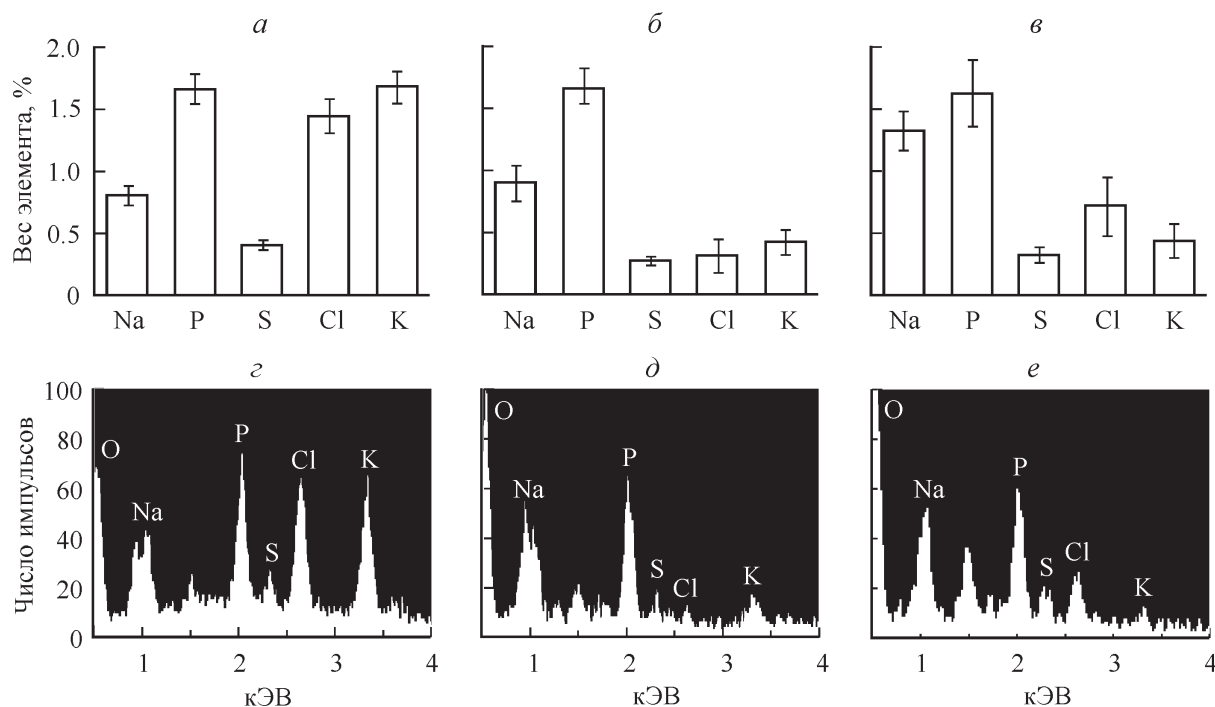


Рис. 6. Элементный состав легкой и тяжелой фракций клеток U-937, разделенных в градиенте Перколла и находящихся 4 ч в среде RPM1, содержащей 200 мМ сахарозы.

a — верхняя фракция, гистограмма построена на основании рентгеновских спектров 21 клетки; соотношение Na/K составляет 0.4. *б, в* — нижняя фракция, гистограмма построена на основании анализа рентгеновских спектров пяти (*б*) или семи (*в*) клеток; соотношение Na/K составляет 2.0 (*б*) или 3.2 (*в*); *з–е* — рентгеновский спектр единичной клетки в верхней (*з*) и нижней (*д, е*) фракциях. Спектры набирали при ускоряющем напряжении 80 (*а, б, з, д*) или 40 (*в, е*) кВ в течение 300 с.

ральный анализ на целых клетках. К сожалению, электронно-микроскопический анализ таких клеток в просвечивающем режиме не позволял дифференцировать различные типы клеток. Однако, как правило, в тяжелой фракции клеток с увеличенным соотношением Na/K было значительно больше, чем в легкой.

На рис. 6 представлены усредненные данные содержания исследуемых элементов в легкой и тяжелой фракциях клеток. Гистограмма построена на основании анализа рентгеновских спектров 21 отдельной клетки для верхней фракции и 7 и 5 клеток для нижней. В первом случае соотношение Na/K приблизительно равно 0.4, а во втором — больше 2 (рис. 5, 6). Для наглядности мы приводим одиночные спектры из представленных гистограмм (контрольной и апоптозной клеток), в которых изменения концентраций ионов Na^+ и K^+ наиболее ярко выражены (рис 5, 6).

Обсуждение

Продемонстрированные изменения морфологии клеток U-937 при апоптозе, вызванном гипертоническим шоком, похожи на те, которые разные авторы наблюдали при апоптозе, вызванном другими воздействиями и на других клетках (Saraste, Pulkki, 2000; Bonnano et al., 2002; Mita et al., 2003; Bottone et al., 2013). Вместе с тем мы выявили ряд дополнительных существенных перестроек клеточных органелл при входе клеток U-937 в апоптоз, а также провели иммуно-цитохимическое исследование протеасом. С помощью РМА нам удалось провести сравнительное изучение содержания Na^+ и K^+ на уровне единичной клетки в контрольных и апоптозных клетках.

На ультраструктурном уровне мы наблюдали морфологические изменения клеток, которые, в общем, соответствуют тем изменениям, которые описаны в литературе. При условиях синхронизации клеточных культур можно распределить все изменения по временным отрезкам (Kerr et al., 1972; Saraste, Pulkki, 2000). В нашем же случае в отсутствие синхронизации культуры мы разделяем клетки в градиенте Перколла по их плавучей плотности, что соответствует их принадлежности к разным этапам апоптоза (Веренинов и др., 2004; Yurinskaya et al., 2005a, 2005b, 2012; Юринская и др., 2011). В верхней, более легкой, фракции оказываются клетки, наименее изменившие свою морфологию, по плотности цитоплазмы мало отличающиеся от необработанных клеток, которые мы называем светлыми, тогда как в нижней фракции клетки находятся в одной из сильно развитых фаз апоптоза. В этих клетках значительно уменьшено количество микроворсинок, уплотнена цитоплазма, конденсирован хроматин, ядра разделены на фрагменты, нарушена структура АГ. Анализ темных и светлых клеток позволяет предположить, что темные клетки представляют собой терминальную фазу апоптоза, так как в них критически изменены внутриклеточные органеллы.

Измерения светлых клеток на ранних этапах апоптоза в световом микроскопе демонстрируют некоторое набухание цитоплазмы и увеличение их размеров, тогда как темные клетки с прогрессирующим апоптозом уплотняются и уменьшаются в своих размерах.

Одним из основных критериев апоптоза в клетке принято считать формирование апоптозных тел (Bonnano et al., 2002). Действительно, переходные картины отпочковывания апоптозных тел наблюдаются как в светлых, так и в темных клетках. Последние в конце этого процес-

са распадаются на отдельные фрагменты, не содержащие внутриклеточных органелл. Затем апоптозные тела в ткани фагоцитируются макрофагами, тогда как в клеточной культуре происходит их накопление (Arden, Betenbaugh, 2004).

Еще один общий характерный признак светлых и темных клеток U-937, обнаруженный в настоящей работе, — это появление в их ядре и цитоплазме агрегатов осмиофильных палочковидных частиц, не ограниченных мембраной и отличающихся по своей морфологии и размерам от интерхроматиновых гранул. Проведенный ультроструктурный анализ позволил нам интерпретировать эти частицы как протеасомы (Снигиревская, Комиссарчик, 2014). Размеры этих структур слегка превышают размеры выделенных и негативно окрашенных протеасом, что, возможно, связано с сохранением их состояния при обработке материала, более близкого к нативному, чем после их выделения (Zoeger et al., 2006). В отличие от выделенных этими авторами протеасом 20S в цитоплазме клеток в настоящей работе скорее всего выявляются нативные протеасомные комплексы 26S. Кроме того, протеасомы, выявляющиеся в цитоплазме, связаны с убиквитином и гидролизуются в них белками, которые также определяют увеличение их размеров. К сожалению, протеасомы не имеют четко очерченных контуров, как другие внутриклеточные органеллы, сформированные мембранами. Поэтому трудно говорить о деталях их структурной организации, выявляемой на ультратонких срезах залитого в смолу материала. Иммуноцитохимическая реакция на субъединицу белкового комплекса протеасом $\alpha 7$ подтвердила их протеасомную природу (Снигиревская, Комиссарчик, 2014).

Полученные нами данные указывают на то, что наблюдаемые агрегаты протеасом выявляются не только в клетках и апоптозных телах, но и во внеклеточном пространстве, куда они экструдируются на терминальных стадиях апоптоза (Снигиревская, Комиссарчик, 2014). Эти экстрацеллюлярные протеасомы также метятся с помощью поликлональных антител к субъединице белка протеасом $\alpha 7$. То, что существование экстрацеллюлярных протеасом возможно, подтверждается данными из литературы. Как было упомянуто выше, методом негативного контрастирования изучены протеасомы, выделенные из плазмы крови человека, так называемые циркулирующие протеасомы (Zoeger et al., 2006). Кроме того, описано присутствие экстрацеллюлярных протеасом в альвеолярных пространствах легких человека при острых респираторных заболеваниях с применением иммунной ЭМ (Sixt, Peters, 2010). Однако следует отметить, что ни в одной из работ, посвященных исследованию структурной или функциональной организации протеасом, нет данных о морфологии этих частиц *in situ*, аналогичных тем, которые мы получили в настоящей работе.

Процессы агрегации осмиофильных внутриклеточных частиц описаны в литературе при апоптозе как индуцированном, так и при спонтанном. Внешними индукторами апоптоза могут быть перегрев, гипертония, гипоксия, активные формы кислорода, вирусы и др. (Scovassi, Torriglia, 2003; Beckman, Parker, 2008; Gallo et al., 2008). Спонтанный апоптоз связан с дифференцировкой клеток и тканей и происходит, например, в процессе спермиогенеза (Kotaja, Sassone-Corsi, 2007; Vasileva et al., 2009; Снигиревская и др., 2012; Mosevitsky et al., 2012) или во время спячки животных (Biggiogera et al., 1998, 2004). Описанным агрегатам присвоены различные наименова-

ния: PB (processing body), HERDs (heterogeneous ectopic RNP-derived structures), агресомы, хроматоидные тельца, стресс-гранулы, у прокариот — включения и др. На основании многих фактов было высказано предположение о том, что все вышеназванные агрегаты частиц появляются в клетках в условиях подавленных транскрипционных процессов в ядре и выполняют в клетках функцию запасаения и деградации различных мРНК, РНП и белков (Scovassi, Torriglia, 2003; Biggiogera et al., 2004; Beckman, Parker, 2008; Gallo et al., 2008; Снигиревская и др., 2012). Наряду с запасаемыми мРНК, РНП и белками в вышеперечисленных агрегатах частиц с помощью иммуноцитохимических методов обнаружено много ферментов и сигнальных белков, которые участвуют в их модификации (Kotaja, Sassone-Corsi, 2007; Vasileva et al., 2009; Meikar et al., 2010; Mosevitsky et al., 2012). В них широко представлены, в частности, компоненты убиквитин-протеасомной системы (Wójcik, DeMartino, 2003; Haraguchi et al., 2007; Yokota, 2008; Gutierrez et al., 2009).

Ранее мы высказали предположение о том, что обнаруженные нами агрегаты частиц представляют собой агресомы, в которых происходит протеолиз неправильно свернутых или сверхэкспрессированных белков (Снигиревская, Комиссарчик, 2014). Выявление нами протеасом в составе агрегатов вполне совпадало с этой точкой зрения. Однако анализ имеющихся в литературе работ показал, что агресомы часто обнаруживаются вблизи centrosомы (Johnston et al., 1998; Kopito, Sitia, 2000). Предполагается, что в эту зону белки, предназначенные для элиминации, доставляются по микротрубочкам динеинопосредованным образом (Taylor et al., 2003). В клетках же U-937 мы не выявили колокализации агрегатов с центриолами, которые нередко видны в цитоплазме клеток, находящихся в состоянии апоптоза. Кроме того, агрегаты в клетках U-937 локализуются не только в цитоплазме, но и в ядре. Возможность локализации агресом в ядре в некоторых работах оспаривается. Стоит отметить, что провести четкую грань между различными типами агрегатов частиц в клетках, испытывающих стресс, представляется довольно сложной задачей, так как при наличии у них общих черт разные авторы приписывают им наблюдаемые только ими особенности.

По всей вероятности, наибольшее сходство, за исключением некоторых ультроструктурных деталей (мы не наблюдаем в составе агрегатов тонких филаментов), обнаруженные нами агрегаты частиц имеют с PB, одной из форм которых, по нашему мнению, можно считать HERDs. Это агрегаты, состоящие из мелких гранул и тонких филаментов, описаны в работах итальянских ученых именно при индукции апоптоза в клетках культуры (Biggiogera et al., 1998, 2004). Описывая типичное для апоптозной клетки серповидное распределение хроматина и его конденсацию, авторы предполагают, что во время апоптоза происходит не только перераспределение хроматина, но и реорганизация РНП-содержащих структур в интерхроматиновом пространстве, в котором локализована большая часть функций, относящихся к таким ядерным процессам, как транскрипция, сплайсинг и генный сайленсинг (Smako et al., 2003). Эти функции выполняются такими структурами, как перихроматиновые фибриллы, перихроматиновые и интерхроматиновые гранулы и ядрышко. В апоптозе эти структуры и компоненты ядрышка агрегируют в гетерогенные кластеры фибро-гранулярного материала в интерхроматиновом пространстве — HERDs (Biggiogera et al., 1998). Затем они

переносятся в цитоплазму и в конце концов высвобождаются на клеточной поверхности внутри апоптотических тел. HERDs помечены авторами специфическими антителами к различным протеинам, за исключением белков протеасом (Biggiogera et al., 1998, 2004).

По данным литературы, в расщеплении РНП участвуют как каспазы, так и другие протеолитические ферменты (например, кальпаины, катепсины и другие сериновые протеазы). Они же описаны и как участники запрограммированной клеточной смерти (Scovassi, Torriglia, 2003). Есть мнение, что HERDs являются местами запасания РНП и белков, когда их внутриклеточное содержание превышает способность связывать вновь транскрибированные разные мРНК (Biggiogera et al., 1998, 2004). Авторы рассматривают комплексы HERDs как маркеры необратимого ареста процессов транскрипции в ядре.

Таким образом, по аналогии с имеющимися в литературе данными можно полагать, что агрегаты в клетках U-937 в условиях индуцированного гипертоническим раствором сахарозы апоптоза также содержат различные мРНК, РНП, а также неправильно свернутые и оверэкспрессированные белки, предназначенные для элиминации их путем протеолиза с помощью убиквитин-протеасомной системы. Пока нами выявлен только один компонент этой системы — протеасомы. Но их наличие является косвенным доказательством участия в этих процессах и белка убиквитина, так как оба компонента работают в ансамбле.

О наличии в цитоплазме апоптотических клеток лишних (нефункциональных) белков могут свидетельствовать изменения, которым подвергается во время апоптоза АГ. В темных клетках АГ претерпевает драматические изменения. Нарушения параллельности цистерн, их разбухание, закручивание мембран Гольджи являются свидетельством нарушения связи между отдельными цистернами. Это подтверждается имеющимися в литературе данными по необратимой фрагментации АГ во время развития апоптоза (Mukherjee, Shields, 2009). Показано, что происходит каспазоопосредованное расщепление нескольких спиральнозакрученных белков с высокой молекулярной массой — гольджинов (GM130, golgin 160, G vesicle tethering protein p115), которые участвуют в связывании мембран цистерн АГ между собой. В этой же работе показано, что происходит ингибирование процессов секреции, а именно выведения синтезированных клетками белков. Вполне возможно, что эти белки, накапливаясь в цитоплазме, пополняют содержимое наблюдаемых агрегатов.

Полученные в настоящей работе результаты РМА элементного состава клеток согласуются с результатами других работ. Скеппер с соавторами (Skepper et al., 1999) показали, что при апоптозе моноцитов (макрофагов), вызванном 3-часовым воздействием окисленного липопротеина низкой плотности концентрация калия падает, а натрия растет. В другой работе (Salido et al., 2004) апоптоз клеток рака простаты LNCaP индуцировался этопозидом. Изменения внутриклеточной концентрации ионов количественно анализировали с помощью РМА. Обработка этопозидом вызывала уменьшение содержания K^+ и увеличение содержания Na^+ , которые ингибировались нейрорепептидами — бомбезином или кальцитонином. Этопозид вызывал также изменения внутриклеточной концентрации фосфора и серы. В работе других авторов апоптоз клеток культуры гистиоцитарной лимфомы U-937 индуцировался стауроспорином (Arrebola et al., 2004, 2005). Авторы выявили две фазы изменений содержания эле-

ментного состава исследованных клеток (в основном Na^+ , Cl^- и K^+). Ранняя фаза, которая предваряет активацию каспазы-3, характеризовалась уменьшением внутриклеточного K^+ и Cl^- и совпала по времени с сокращением клеточного объема. Вторая фаза определяется началом активации каспазы-3 и продолжающимся значительным уменьшением содержания K^+ и увеличением Na^+ . Такое инвертированное состояние внутриклеточного содержания этих элементов авторы, как, впрочем, и ряд других исследователей, связывают с ингибированием Na^+,K^+ -АТФазы (Bortner, Cidlowski, 2007). Несмотря на значительное количество исследований, посвященных анализу изменений внутриклеточного содержания Na^+ и K^+ на уровне единичной клетки в процессе апоптоза, вызванном различными индукторами, мы не нашли работ, в которых изучалось бы изменение содержания этих элементов в клетках, у которых апоптоз был вызван гипертоническим шоком. Проведенное нами исследование восполнило этот пробел.

В заключение следует подчеркнуть, что, несмотря на многочисленные исследования апоптотического процесса, до сих пор остается много нерешенных вопросов, связанных с ультраструктурными характеристиками протеасом, их иммулолокализацией, увеличением их количества в апоптотических клетках, с механизмами формирования и выведения из клеток апоптотических тел и т. д. Расширить наши представления об особенностях ультраструктурной организации апоптотических клеток позволит морфологический анализ с использованием криосрезов и электронно-микроскопической томографии.

Авторы выражают глубокую благодарность инженерам Лаборатории морфологии клетки Института цитологии РАН Э. Османову за неоценимую помощь в проведении работ по рентгеноспектральному анализу элементного состава исследуемых клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 12-04-01669-а и 13-04-00101-а) и программы президента РАН № 7.

Список литературы

- Веренинов А. А., Горячая Т. С., Матвеев В. В., Мошков А. В., Розанов Ю. М., Сакута Г. А., Широкова А. В., Юринская В. Е. 2004. Дегидратационное сокращение объема клеток при апоптозе — факультативный признак. Апоптоз клеток U-937, вызванный стауроспорином и этопозидом. Цитология. 46 (7): 609—619. (Vereninov A. A., Goryachaya T. S., Matveev V. V., Moshkov A. V., Rozanov Yu. M., Sakuta G. A., Shirokova A. V., Yurinskaya V. E. 2004. Dehydration shrinkage of cell volume under apoptosis is not obligatory. Apoptosis of U-937 cells induced by staurosporin and etoposide. Tsytologiya. 46 (7): 609—619.)
- Миронов А. А., Комиссарчик Я. Ю., Миронов В. А. 1994. Методы электронной микроскопии в биологии и медицине. СПб.: Наука. 495 с. (Mironov A. A., Komissarchik Ya. Yu., Mironov V. A. 1994. Methods of electron microscopy in biology and medicine. SPb.: Nauka. 496 p.)
- Снигиревская Е. С., Комиссарчик Я. Ю. 2014. Электронно-микроскопическое выявление протеасом в апоптотических клетках U-937 in situ. Докл. РАН. 454 (6): 1—4. (Snigirevskaya E. S., Komissarchik Ya. Yu. 2014. In situ electron microscopic detection of proteasomes in apoptotic U937 cells. Doklady RAS. 454 (6): 633—636.)

- Снигиревская Е. С., Мосевичкий М. И., Комиссарчик Я. Ю. 2012. Роль хроматидных телец и цитоскелета в дифференцировке сперматозондов крысы. Цитология. 54 (3) : 200—213. (Snigirevskaya E. S., Mosevitsky M. I., Komissarchik Ya. Yu. 2012. Role of chromatoid bodies and cytoskeleton in the differentiation of rat sperms. Tsitologiya. 54 (3) : 200—213.)
- Широкова А. В. 2007. Апоптоз. Сигнальные пути и изменение ионного и водного баланса клетки. Цитология. 49 (5) : 385—394. (Shirokova A. V. 2007. Apoptosis. Signal pathways and changes of cell ion and water balance. Tsytologiya. 49 (5) : 385—394.)
- Юринская В. Е., Рубашкин А. А., Широкова А. В., Веренинов А. А. 2011. Реакции регуляторного увеличения объема (RVI) и апоптозного уменьшения объема (RVD) у клеток U937 в гипертонической среде. Цитология. 53 (6) : 474—481. (Yurinskaya V. E., Rubashkin A. A., Shirokova A. V., Vereninov A. A. 2011. Reactions of regulated volume increase (RVI) and apoptotic volume decrease (RVD) in cells U937 in hypertonic medium. Tsytologiya. 53 (6) : 474—481.)
- Arden N., Betenbaugh M. J. 2004. Life and death in mammalian cell culture: strategies for apoptosis inhibition. Trends Biotechnol. 22 : 174—180.
- Arrebola F., Canizares J., Cubero M. A., Crespo P. V., Warley A., Fernandez-Segura E. 2005. Biphasic behavior of changes in elemental composition during staurosporine-induced apoptosis. Apoptosis. 10 : 1317—1333.
- Arrebola F., Zabiti S., Canizares J., Cubero M. A., Crespo P. V., Fernandez-Segura E. 2004. Changes in intracellular sodium, chlorine, and potassium concentrations in staurosporine-induced apoptosis. J. Cell. Physiol. 204 : 500—507.
- Beckman C. J., Parker R. 2008. P-bodies, stress granules and viral life cycles. Cell Host Microb. 3 : 206—212.
- Benson R. S. P., Heer S., Dive C., Watson J. M. 1996. Characterization of cell volume loss in CEM-C7A cells during dexamethasone-induced apoptosis. Amer. J. Physiol. Cell Physiol. 270 : C1190—C1203.
- Biggiogera M., Bottone M. G., Pellicciari C. 1998. Nuclear RNA is extruded from apoptotic cells. J. Histochem. Cytochem. 46 : 999—1005.
- Biggiogera M., Scovassi A. I., Soldani C., Vecchio L., Pellicciari C. 2004. Rearrangement of nuclear ribonucleoprotein (RNP)-containing structures during apoptosis and transcriptional arrest. Biol. Cell. 96 : 603—615.
- Bonnano E., Tagliaferro G., Carlà E. C., Montianari G., Spagnoli L. G., Dini L. 2002. Synchronized onset of nuclear and cell surface modifications in U937 cells during apoptosis. Eur. J. Histochem. 46 : 61—74.
- Bortner C. D., Cidlowski A. 2007. Cell shrinkage and monovalent cation fluxes: role in apoptosis. Arch. Biochem. Biophys. 462 : 176—188.
- Bottone M. G., Santin G., Aredia F., Bernocchi G., Pellicciari C., Scovassi A. I. 2013. Morphological features of organelle during apoptosis: an overview. Cell. 2 : 294—305.
- Сmarko D., Verschure P. J., Otte A. P., van-Driel R., Fakan S. 2003. Polycomb group gene silencing proteins are concentrated in the perichromatin compartment of the mammalian nucleus. J. Cell Sci. 116 : 335—343.
- Cotter T. G. 2009. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. Nat. Rev. Cancer. 9 : 501—507.
- Favaloro B., Allocati N., Graziano V., Di Ilio C., and De Laurenzi V. 2012. Role of apoptosis in disease. Aging. 4 : 330—349.
- Gallo C., Munro E., Rasoloson D., Merritt C., Seydoux G. 2008. Processing bodies and germ granules are distinct RNA granules that interact in *C. elegans* embryos. Develop. Biol. 323 : 76—87.
- Glickman M. H., Ciechanover A. 2002. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. Physiol. Rev. 82 : 373—428.
- Gutiérrez B., Osorio L., Motta M. C. M., Huima-Byron T., Erdjument-Bromage H., Muñoz C., Sagua H., Mortara R. A., Escheverría A., Araya J. E., Gonzales J. 2009. Molecular characterization of and intracellular distribution of the alpha 5 subunit of *Trypanosoma cruzi* 20S proteasome. Parasitol. Int. 58 : 367—374.
- Haraguchi C., Mabuchi M., Hirata S., Shoda T., Tokumoto T., Hoshi K., Yokota S. 2007. Possible function of caudal nuclear pocket: degradation of nucleoproteins by ubiquitin-proteasome system in rat spermatids and human sperm. J. Histochem. Cytochem. 55 : 585—595.
- Johnston J. A., Ward C. L., Kopito R. R. 1998. Aggresomes: a cellular response of misfolded proteins. J. Cell Biol. 143 : 1883—1909.
- Kerr J. F. R., Wyllie A. H., Currie A. R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br. H. J. Cancer. 26 : 239—257.
- Kopito R. R., Sittia R. 2000. Aggresomes and Russell bodies. Symptoms of cellular indigestion? EMBO Reports. 1 : 225—231.
- Kotaja N., Sassone-Corsi P. 2007. The chromatoid body: a germ-cell-specific RNA-processing centre. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 8 : 85—90.
- Livinskaya V. A., Ivanov V. A., Fedorova O. A., Vorontsova D. N., Barlev N. A., Nikiforov A. A. 2012. Polyclonal antibodies against human proteasome subunits PSMA3, PSA5, and PSMB5. Hybridoma. 31 : 272—278.
- Maghsoudi N., Zakeri Z., Lockshin R. A. 2012. Programmed cell death and apoptosis — where it came from and where it is going: from elie metchnikoff to the control of caspases. Exp. Oncol. 34 : 146—152.
- Meikar O., Da Ros M., Liljenback H., Toppari J., Kotaja N. 2010. Accumulation of piRNAs in the chromatoid bodies purified by a novel isolation protocol. Exp. Cell Res. 316 : 1567—1575.
- Mita P., De Luca A., Abbro L., Dini L. 2003. Ultrastructural analysis of apoptosis U937 cells conditioned medium. Italian J. Zool. 70 : 141—146.
- Mosevitsky M. I., Snigirevskaya E. S., Komissarchik Ya. Yu. 2012. Immunoelectron microscopic study of BUSP1 and MARCKS location in the early and late spermatids. Acta histochem. 114 : 237—243.
- Mukherjee S., Shields D. 2009. Nuclear import is required for the pro-apoptotic function of the Golgi protein p115. J. Biol. Chem. 284 : 1709—1717.
- Offen D., Ziv I., Gorodin S., Barzilai A., Malik Z., Melamed E. 1995. Dopamine-induced programmed cell death in mouse thymocytes. Biochim. biophys. acta. 1268 : 171—177.
- Portt L., Norman G., Clapp C., Greenwood M., Greenwood M. T. 2011. Anti-apoptosis and cell survival: a review. Biochim biophys. acta. 1813 : 238—259.
- Salido M., Vilches J., Roomans G. M. 2004. Changes in elemental concentrations in LNCaP cells are associated with a protective effect of neuropeptides on etoposide-induced apoptosis. Cell Biol Int. 28 : 397—402.
- Samm N., Werner K., Rückert F., Saeger H. D., Grutzmann R., Pilarsky C. 2011. The role of apoptosis in the pathology of pancreatic cancer. Cancers. 3 : 1—16.
- Saraste A., Pulkki K. 2000. Morphological and biochemical hallmarks of apoptosis. Cardiovasc. Res. 45 : 528—537.
- Scovassi A. I., Torriglia A. 2003. Activation of DNA-degrading enzymes during apoptosis. Eur. J. Histochem. 47 : 185—194.
- Sixt S. U., Peters J. 2010. Extracellular alveolar proteasomes. Possible role in lung injury and repair. Proc. Am. Thorac. Soc., 7 : 91—96.
- Skepper J. N., Karydis I., Garnett M. R., Hegyi L., Hardwick S. J., Warley A., Michinson M. J., Cary N. R. B. 1999. Changes in elemental concentrations are associated with early stages of apoptosis in human monocyte-macrophages exposed to oxidized low density lipoprotein: an X-ray microanalytical study. J. Pathol. 188 : 100—106.
- Taylor J. P., Tanaka F., Robitschek J., Sandoval C. M., Taya A., Markovic-Plese S., Fischbeck K. H. 2003. Aggresomes protect cells by enhancing the degradation of toxic polyglutamine-containing protein. Hum. Mol. Genet. 12 : 749—757.
- Vasileva A., Tiedau D., Firooznia A., Muller-Reichert T., Jesberger R. 2009. Tdrd6 is required for spermiogenesis, chromatoid

body architecture, and regulation of miRNA expression. *Curr. Biol.* 19 : 630—639.

Wójcik C., DeMartino G. N. 2003. Intracellular localization of proteasomes. *Intern. J. Biochem. Cell Biol.* 35 : 579—589.

Wyllie A. H. 1980. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature.* 284 : 555—556.

Yokota S. 2008. Historical survey on chromatoid body research. *Acta histochem. cytochem.* 41 : 65—82.

Yurinskaya V. E., Goryachaya T. S., Guzhova I., Moshkov A. V., Rozanov Y. M., Sakuta G. A., Shirokova A. V., Shumilina E., Vassiliev I., Lang F., Vereninov A. A. 2005a. Potassium and sodium balance in U937 cells during apoptosis with and without cell shrinkage. *Cell Physiol. Biochem.* 16 : 155—162.

Yurinskaya V. E., Moshkov A. V., Rozanov Y. M., Shirokova A. V., Vassiliev I. O., Shumilina E. V., Lang F., Volgareva E. V., Vereninov A. A. 2005b. Thymocyte K⁺, Na⁺ and water balance during dexamethasone- and etoposide-induced apoptosis. *Cell Physiol. Biochem.* 16 : 15—22.

Yurinskaya V. E., Moshkov A. V., Wibberley A. V., Lang F., Model M. A., Vereninov A. A. 2012. Dual response of human leukemia U937 cells to hypertonic shrinkage: initial regulatory volume increase (RVI) and delayed apoptotic volume decrease (AVD). *Cell Physiol. Biochem.* 30 : 964—973.

Zoeger A., Blau M., Egerer K., Feist E., Dahlmann B. 2006. Circulating proteasomes are functional and have a subtype pattern distinct from 20S proteasomes in major blood cells. *Clinical Chem.* 52 : 2079—2086.

Поступила 1 VIII 2014

ULTRASTRUCTURAL AND X-RAY SPECTRAL ANALYSIS OF CELLS U-937 DURING APOPTOSIS PROCESS INDUCED BY HYPERTONY

E. S. Snigirevskaya,¹ A. V. Moshkov,¹ V. E. Yurinskaya,¹ A. A. Vereninov,¹ Ya. Yu. Komissarchik^{1, 3, *}

¹ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, and ² St. Petersburg State University;

* e-mail: yykomis@incras.ru

The results of this work concerning ultrastructural changes of U-937 cells in a state of apoptosis are largely in consistent with the same information available in the literature. However, we have got the original data on the ultrastructural changes of cell organelles and immune localization and distribution of proteasomes. It has been demonstrated that Golgi apparatus is located close to the plasma membrane in the case of apoptosis induced by incubating the cells in a hypertonic suchrose solution (200—400 mM). The fact can be considered as an indirect indication of depolymerization of cytoskeletal elements, in particular, MTs maintaining Golgi apparatus in a cell centre. In the later stages of apoptosis, the distances between Golgi cisterna are significantly increased. It can be explained by hydrolysis of golgins binding cisterna between each other. Mitochondria are not significantly changed in these cells. They have regularly disposed crista and sufficiently dense matrix with a few vacuoles. Proteasomes as rod-shaped osmiophilic particles (12 × 30 nm) have been revealed during each apoptosis stage both in nuclei and cytoplasm of cells studied. The particles form aggregates of different densities and sizes unlimited by membrane. It has been proposed that the particle aggregates revealed in the work are analogous to «processing bodies» or aggresomes described in the literature. They can be detected in cells under conditions of suppressed nucleus transcriptional processes in the nucleus and participate in storing and degradation of various mRNAs, RNP and proteins. The changes of intracellular contents of Na and K in a single cell during apoptosis induced by osmotic shock have been revealed using method of X-ray microanalysis. It has been demonstrated the increase in the ratio of intracellular contents Na⁺/K⁺ in the most of apoptotic cells in comparing with control cells.

Key words: U-937 cells, apoptotic bodies, chromatin condensation, proteasomes, microtubules, Golgi apparatus, X-ray microanalysis, immunocytochemistry.