

©Коллектив авторов

## ВЫЯВЛЕНИЕ “БОКОВОЙ ПОПУЛЯЦИИ”, АССОЦИИРОВАННОЙ С АКТИВНОСТЬЮ АТР-ЗАВИСИМЫХ ТРАНСПОРТЕРОВ, ПРИ ПОМОЩИ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ С ВИЗУАЛИЗАЦИЕЙ

А.М. Гисина\*, Я.С. Ким, К.Н. Ярыгин, А.Ю. Лунатов

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,  
119121, Москва, Погодинская ул., 10; \*эл. почта: alisa.gisina@gmail.com

На клеточных линиях колоректальной аденокарциномы человека SW480, HT-29, Caco-2 проанализирована эксклюзия витального красителя DyeCycle Violet, обусловленная активностью АТР-зависимых транспортеров. При сходстве цитометрических данных, полученных с помощью проточного цитометра FACS Aria III и проточного цитометра с микроскопией высокого разрешения ImageStreamX Mk II, применение проточной цитометрии с функцией визуализации позволило охарактеризовать морфологию клеток “боковой популяции”, а также других популяций клеток, отличающихся по степени накопления красителя. Особый интерес вызывает популяция клеток более мелких, чем клетки “боковой популяции”, которые практически не окрашиваются красителем. Не исключено, что эта популяция может вносить свой вклад в устойчивость опухоли к химиотерапии.

**Ключевые слова:** проточная цитометрия с визуализацией; “боковая популяция”; витальный краситель DyeCycle Violet; колоректальная аденокарцинома

**DOI:** 10.18097/PBMC20216702137

### ВВЕДЕНИЕ

Анализ эксклюзии витальных красителей является способом оценки устойчивости раковых клеток к химиопрепаратам [1]. Данное свойство обусловлено гликопротеинами, ответственными за активный энергозависимый транспорт веществ через мембраны клеток. Эти гликопротеины объединены в суперсемейство АТР-связывающих кассетных белков, из них около 50 белков-транспортеров представлены в клетках человека. Энергозависимые клеточные помпы предпочитают транспортируют липофильные катионные молекулы, причём один транспортер может действовать на структурно различные субстраты [2]. Применение метода проточной цитометрии для подобных исследований позволило выявить особую популяцию раковых клеток, которая обладает повышенной способностью к откачиванию чужеродных веществ [3]. Впервые данная методика была реализована с применением флуоресцентного ДНК-связывающего красителя Hoechst 33342, возбуждаемого ультрафиолетовым лазером. Для Hoechst 33342 характерна флуоресценция в синем диапазоне (Hoechst-blue), в то же время при связывании с ДНК он излучает также и в красном диапазоне (Hoechst-red). При регистрации флуоресценции одновременно на двух длинах волн на точечном графике обнаружили маленькую, отстоящую в стороне популяцию клеток, которую и назвали “боковой популяцией”. При добавлении ингибитора кальциевых каналов верапамила данная популяция исчезала. Это свидетельствовало о том, что интенсивность окрашивания клеток исследуемой популяции связана с активностью АВС-транспортеров, блокируемых верапамилом [4]. Впоследствии был предложен краситель DyeCycle Violet (DCV), который позволяет воспроизводить данную методику с использованием более распространённого фиолетового лазера [5].

Метод “боковой популяции” был применён ко многим раковым клеточным линиям и к опухолевому материалу, полученному непосредственно из ткани пациентов. Считается, что “боковая популяция” ассоциирована с популяцией раковых стволовых клеток (РСК), которая может быть идентифицирована с использованием молекулярных маркеров [6, 7]. Однако проведённые к настоящему времени исследования демонстрируют противоречивые результаты. В исследованиях *in vivo* с использованием ксенотрансплантации была показана повышенная способность клеток “боковой популяции”, выделенных из линий гепатоцеллюлярной карциномы [8], назофарингеальной карциномы [9], карциномы лёгких [10], желудка [11], формировать опухоли в иммунодефицитных мышах по сравнению с клетками, не входящими в состав “боковой популяции”. Однако для ряда клеточных линий рака желудочно-кишечного тракта было продемонстрировано, что выделенные клетки “боковой популяции” и остальные опухолевые клетки обладали идентичным клоногенным потенциалом *in vitro*, опухолеобразующим потенциалом *in vivo* и демонстрировали сходный дифференцировочный потенциал *in vitro* и *in vivo* [12]. Причина противоречивых результатов может быть связана со сложностью идентификации конкретной популяции клеток при цитометрии [13].

Проточная цитометрия в её классическом варианте позволяет получать данные об интенсивности флуоресценции клеток, а также интенсивности их прямого и бокового светорассеивания. Недавно появившийся метод проточной цитометрии с визуализацией помимо вышеуказанных параметров позволяет получать изображение каждой клетки, находящейся в потоке. Таким образом, он объединяет в себе возможности проточной цитометрии и флуоресцентной микроскопии, что делает возможным

анализ морфологических признаков клеток на основе полученных изображений [14]. На данный момент проточная цитометрия с визуализацией была использована только для анализа “боковой популяции” клеток множественной миеломы [15, 16]. Работы, в которых используют проточную цитометрию с визуализацией для анализа “боковой популяции” солидных опухолей, отсутствуют.

Целью данной работы было сравнение особенностей “боковых популяций”, выявленных методом “классической” цитометрии и цитометрии с визуализацией, а также описание морфологических характеристик клеток “боковой популяции” и других клеток линий колоректальной аденокарциномы, отличающихся степенью накопления витального красителя DCV.

## МЕТОДИКА

Клеточные линии колоректальной аденокарциномы человека Сасо-2, HT-29 и SW480 культивировали в среде DMEM/F12 (“ПанЭко”, Россия), с добавлением 10% ЭТС (“Gibco”, США) в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (“Sanyo”, Япония) при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в культуральных флаконах (“Greiner”, США). При достижении 90% конfluence клетки переводили в суспензию с использованием аккутазы (“StemPro”, США). Суспензию клеток (10<sup>6</sup> клеток/мл) в среде DMEM+ (среда DMEM без фенолового красного, с добавлением 2 mM HEPES и 2% ЭТС) разделяли на образцы по 1 мл и нагревали в водяной бане до 37°C. В контрольные образцы добавляли 5 мкл стокового раствора верапамила (5 мг/мл в этаноле). Далее в опытные и контрольные образцы добавляли 2 мкл водного раствора красителя DyeCycle Violet (DCV) (5 mM). После инкубации 90 мин на водяной бане при 37°C с периодическим встряхиванием на минишейкере образцы центрифугировали 3 мин при 300 g, отбирали супернатант, клетки ресуспендировали в холодном DMEM+ и помещали на лёд. Для определения жизнеспособности добавляли 1 мкл пропидиума йодида (PI) (50 мкг/мл) за 5 мин до начала анализа. Образцы держали на льду в темноте.

Цитометрический анализ эксклюзии DCV без визуализации производили с применением проточного цитометра FACSAria III (“BD Biosciences”, США). На первом этапе цитометрического анализа из рассматриваемой клеточной популяции исключали клеточный дебрис и дуплеты на основе параметров прямого и бокового светорассеяния. Мёртвые клетки исключали по признаку положительного окрашивания красителем PI. Для возбуждения флуоресценции красителя DCV применяли фиолетовый лазер (405 нм). Эмиссию флуоресценции детектировали в красном диапазоне с использованием фильтров BP660/20 и LP610 и в синем диапазоне — с использованием BP450/40. Наличие слабоокрашенной “боковой популяции” выявляли на точечном графике интенсивности флуоресценции DCV с линейной системой координат в синем и красном диапазоне.

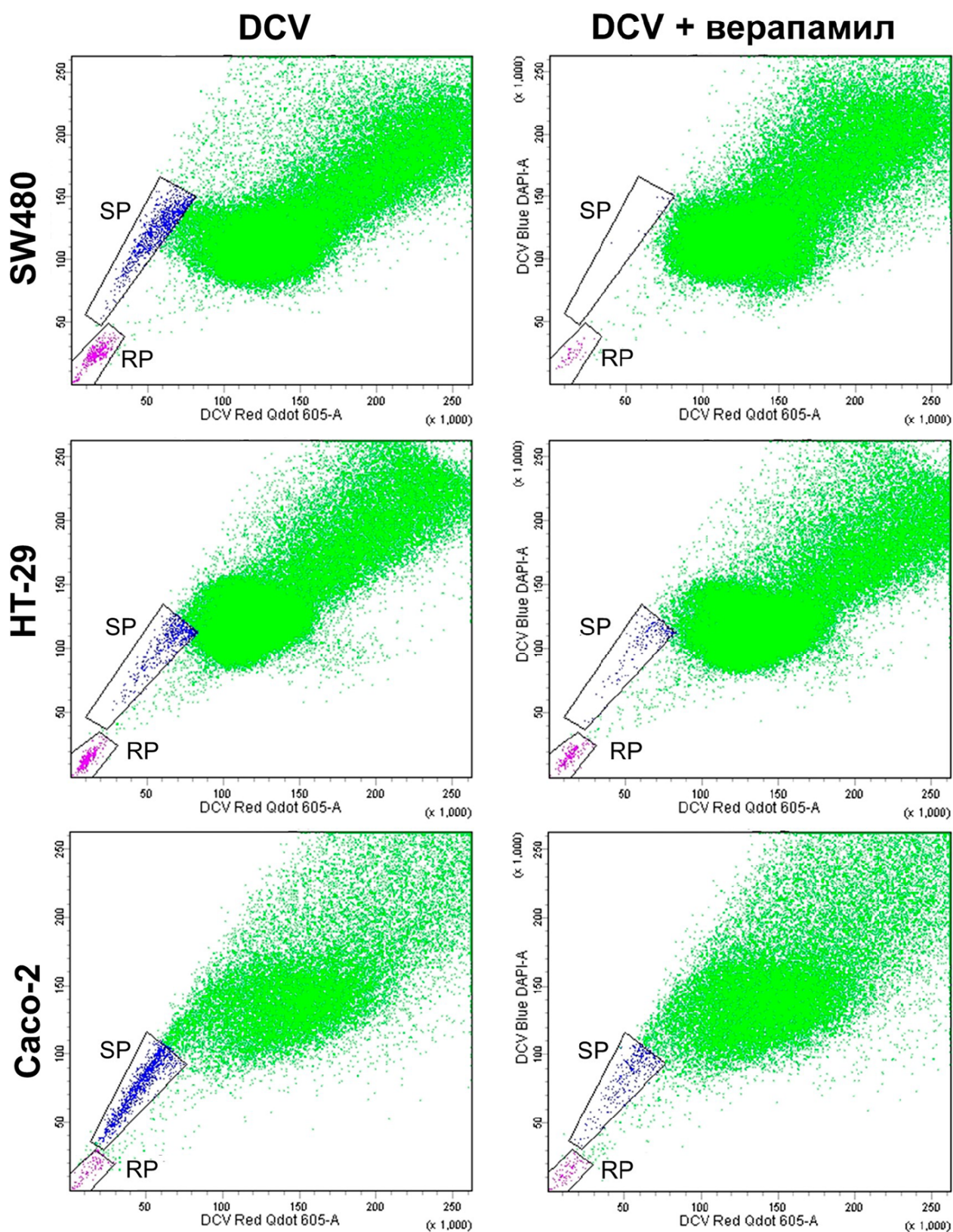
Проточную цитометрию с визуализацией клеток проводили с применением проточного цитометра ImageStreamX Mk II (“Luminex”, США). Параметры

сбора данных были следующими: core size — 10 мкм, скорость сбора данных — низкая, увеличение — ×40, мощности лазеров: 405 нм — 4 мВт, 488 нм — 100 мВт, 785 нм — 4 мВт, каналы светлого поля — Ch01 и Ch09. Для каждого образца собирали 50 тысяч событий. Анализ данных производили с помощью программы IDEAS (версия 6.2.) Для исключения из анализа агрегатов клеток и дебриса параметр “Aspect Ratio\_M01\_Ch01” для светлого поля устанавливали минимум на 0,8, параметр “Area\_M01” максимум на 1000 мкм<sup>2</sup>. Мёртвые клетки исключали из анализа на основе интенсивности флуоресценции PI, определяемой по гистограмме “Intensity\_MC\_Ch05”. Клетки, находящиеся в фокусе объектива, определяли по гистограмме “Gradient RMS\_M01\_Ch01”. Флуоресценцию DCV в синем диапазоне детектировали в канале Ch07 (BP 457/45), в красном диапазоне — в канале Ch11 (BP 702/85). Для выявления “боковой популяции” использовали точечный график на основе параметров “Intensity\_MC\_Ch07” и “Intensity\_MC\_Ch11” в линейной системе координат. Площадь клеток разных популяций сравнивали на основе параметра “Area\_M01”, боковое светорассеяние и гранулярность — на основе параметров “Intensity\_MC\_Ch06” и “Bright detail intensity R3\_MC\_Ch06”.

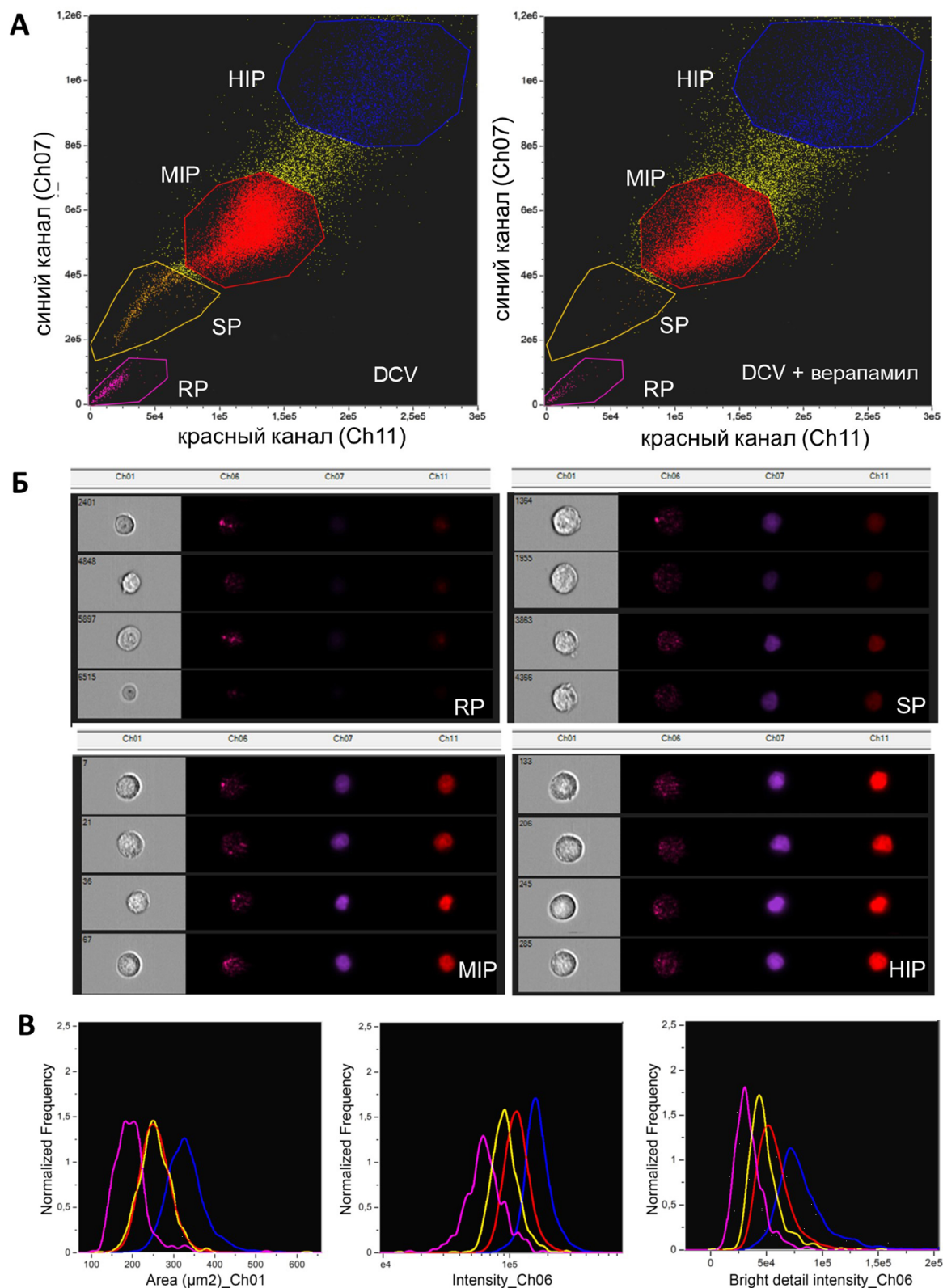
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Прежде всего, мы проанализировали эксклюзию витального красителя DCV с помощью проточного цитометра FACSAria III. Картина, представленная на точечном графике (рис. 1), позволяет идентифицировать “боковую популяцию” (SP) как группу клеток, обладающих минимальной флуоресценцией по красному каналу и располагающихся слева от остальных клеток. Объём “боковой популяции” в исследуемых линиях колоректальной аденокарциномы различался в диапазоне от 0,7% до 3,9% клеток. Помимо клеток, обладающих флуоресценцией в красном и синем спектре, на графике выделяется популяция с очень низкой флуоресценцией по обоим каналам (резистентная популяция (RP)), что свидетельствует об устойчивости этих клеток к окрашиванию DCV. При добавлении верапамила “боковая популяция” заметно сокращалась во всех клеточных линиях (рис. 1). Резистентная популяция была менее чувствительна к действию верапамила, особенно у линий HT-29 и Сасо-2.

Анализ эксклюзии DCV, проведённый с помощью проточного цитометра с визуализацией ImageStreamX Mk II, продемонстрировал те же индивидуальные особенности распределения клеток “боковой популяции” на точечном графике характерные для каждой клеточной линии (рис. 2, 3). Так, “боковая популяция” линии SW480 имела характерную форму “хвоста”, которая указывает на специфическое соотношение интенсивности флуоресценции этих клеток в синем и красном диапазонах (рис. 2а). Объём “боковой популяции”, выявленной с применением ImageStreamX Mk II, был немного больше, чем в случае FACSAria III (табл. 1).

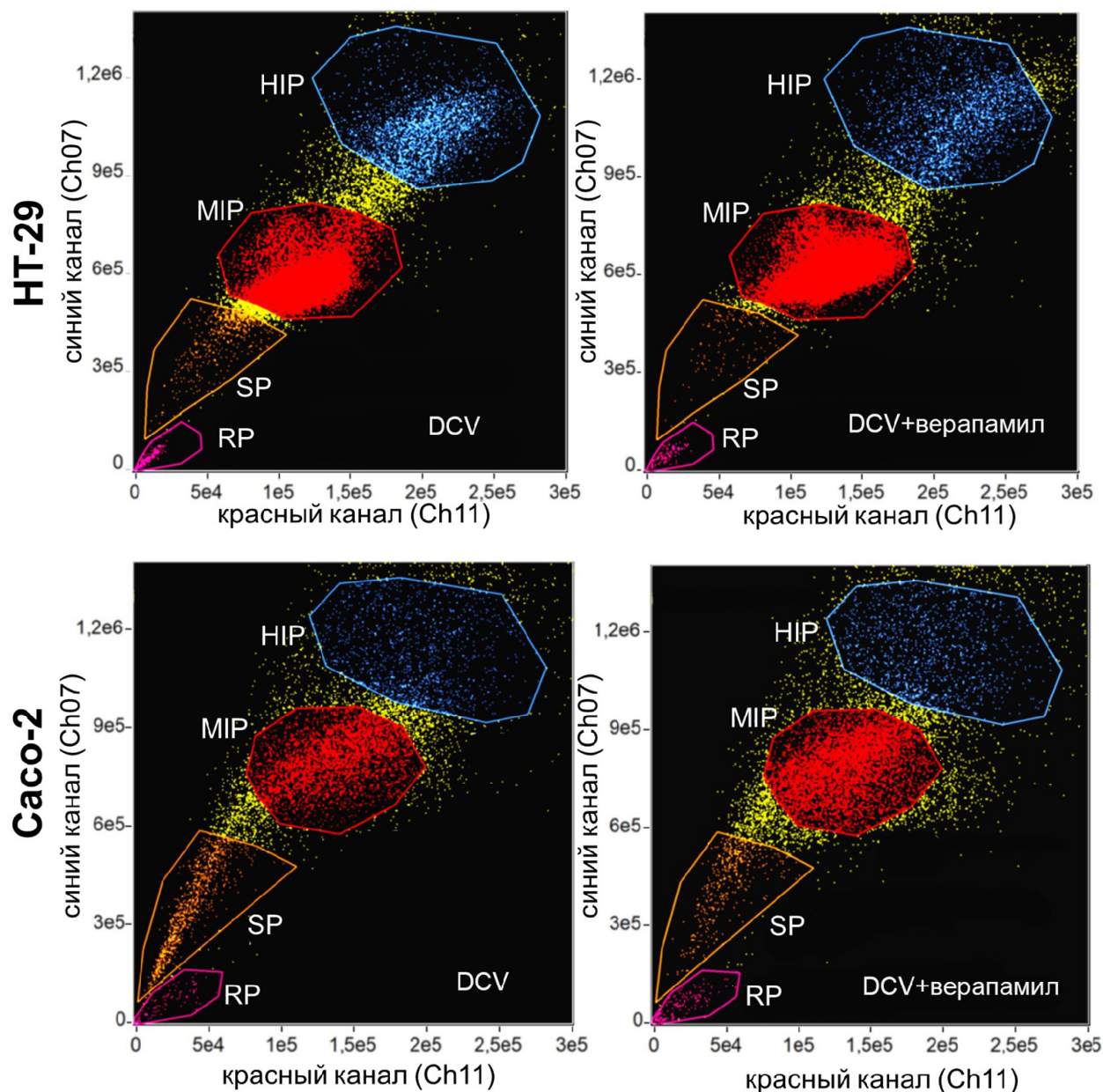


**Рисунок 1.** Анализ эксклюзии витального красителя DyeCycle Violet клетками линий колоректальной аденокарциномы с использованием проточного цитометра FACSaria III. По оси абсцисс — интенсивность флуоресценции в красном диапазоне; по оси ординат — интенсивность флуоресценции в синем диапазоне. SP — “боковая популяция”; RP — резистентная популяция.



**Рисунок 2.** Анализ эксклюзии витального красителя DyeCycle Violet и морфологических особенностей клеточных популяций линии SW480 с использованием проточного цитометра с визуализацией ImageStreamX Mk II. **А** — анализ флуоресценции, по оси абсцисс — интенсивность флуоресценции в красном диапазоне, по оси ординат — интенсивность флуоресценции в синем диапазоне; **Б** — визуализация клеточных популяций; **В** — анализ морфологических особенностей клеток. По оси абсцисс слева направо: площадь двумерной проекции клетки ( $\mu\text{m}^2$ ); интенсивность бокового светорассеяния; интенсивность наиболее ярких точек на клетке. По оси ординат — частота встречаемости клеток с данным признаком. RP — резистентная популяция; SP — “боковая популяция”; MIP — популяция со средней интенсивностью флуоресценции; HIP — популяция с высокой интенсивностью флуоресценции.





**Рисунок 3.** Анализ эксклюзии витального красителя DyeCycle Violet клеточными линиями HT-29 и Caco-2 с использованием проточного цитометра с визуализацией ImageStreamX Mk II. По оси абсцисс — интенсивность флуоресценции в красном диапазоне; по оси ординат — интенсивность флуоресценции в синем диапазоне. RP — резистентная популяция; SP — “боковая популяция”; MIP — популяция со средней интенсивностью флуоресценции; HIP — популяция с высокой интенсивностью флуоресценции.

**Таблица. 1** Процент клеток, устойчивых к окрашиванию DCV и выявленных с применением проточного цитометра FACSAria III и проточного цитометра с визуализацией ImageStreamX MkII.

Клеточные линии	Окрашивание	«Боковая популяция» (%)		Резистентная популяция (%)	
		FACSAria	ImageStream	FACSAria	ImageStream
HT-29	DCV	0,7	2,0	0,3	0,5
	DCV + верапамил	0,2	0,5	0,2	0,4
SW480	DCV	1,2	2,5	0,4	1,4
	DCV + верапамил	0,0	0,3	0,1	0,4
Caco-2	DCV	3,9	9,9	0,4	1,4
	DCV + верапамил	0,9	4,3	0,2	1,1

## ВЫЯВЛЕНИЕ “БОКОВОЙ ПОПУЛЯЦИИ” ЦИТОМЕТРИЕЙ С ВИЗУАЛИЗАЦИЕЙ

Таблица 2. Медианы значения проекции площади клеток и интенсивности их светорассеяния в различных популяциях клеточных линий. Area — площадь двумерной проекции клетки (мкм<sup>2</sup>). IntenCh06 — интенсивность бокового светорассеяния и BrDI — интенсивность свечения наиболее ярких точек (условные единицы). RP — резистентная популяция; SP — “боковая популяция”; MIP — популяция со средней интенсивностью флуоресценции; HIP — популяция с высокой интенсивностью флуоресценции.

Популяция	Клеточная линия								
	SW480			Caco-2			HT-29		
	Area	Inten Ch06	BrDI	Area	Inten Ch06	BrDI	Area	Inten Ch06	BrDI
RP	192	62525	31798	289	90339	48658	213	69784	35852
SP	253	90514	45540	367	197068	99683	280	108476	55242
MIP	254	113019	54448	354	200011	98279	287	132925	65279
HIP	325	163060	77091	433	260804	126926	363	198620	96913

Резистентная популяция с крайне низкой интенсивностью флуоресценции чётко выявляется с использованием обоих приборов. Она присутствует в большинстве опубликованных работ, посвященных анализу “боковой популяции”, однако её природа либо не рассматривается авторами, либо интерпретируется как клеточный дебрис [17]. Визуализация клеток этой популяции с применением ImageStreamX Mk II демонстрирует, что она представлена целыми клетками, а не клеточными фрагментами (рис. 2б). Ранее, на опухолевом материале от больных колоректальным раком мы уже выявляли клеточную популяцию с пониженной, по сравнению с “боковой популяцией”, интенсивностью флуоресценции DCV [18]. Эта популяция клеток должна быть исследована более подробно на предмет её возможного участия в резистентности опухоли к химиотерапии и наличия признаков, характерных для РСК.

Для сравнения морфологических особенностей клеток, отличающихся по устойчивости к окрашиванию, помимо двух популяций с низкой флуоресценцией были проанализированы популяции SW480, обладающие промежуточной (MIP) и наиболее высокой (HIP) флуоресценцией по обоим каналам. Размер клеток был минимальным в резистентной популяции и максимальным в популяции с высокой флуоресценцией. При этом клетки “боковой популяции” и доминирующей в культуре популяции, обладающей промежуточной интенсивностью флуоресценции, имели средний размер и не отличались друг от друга (рис. 2в, левая гистограмма). Это свидетельствует о том, что клетки “боковой популяции” имеют внешнее сходство с большинством клеток в культуре.

Также мы оценили гранулярность клеток четырёх выделенных популяций с помощью анализа бокового светорассеяния. Все клеточные популяции отличались как по общему уровню интенсивности бокового светорассеяния (рис. 2в, гистограмма в центре), так и по уровню интенсивности наиболее ярких точек в канале бокового светорассеяния (рис. 2в, правая гистограмма). Величина этих двух параметров возрастала в популяциях, имеющих более высокую интенсивность флуоресценции, хотя сами параметры не связаны напрямую с флуоресценцией DCV. Интересно, что отличия в уровне бокового светорассеяния и интенсивности свечения наиболее ярких точек были обнаружены, в том числе, между

“боковой популяцией” и популяцией со средней интенсивностью флуоресценции, клетки которых не отличались по размерам. Сходные результаты были получены и для двух других линий колоректальной аденокарциномы (табл. 2).

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование проточной цитометрии с визуализацией для анализа “боковой популяции” позволяет получить данные, аналогичные “классической” цитометрии и дополнить их морфологической характеристикой объекта анализа. Применение этого подхода позволило выявить популяцию клеток колоректальной аденокарциномы, обладающую высокой устойчивостью к окрашиванию витальным красителем DCV и отличающуюся от “боковой популяции” по размерам, параметрам флуоресценции и чувствительности к верапамилу. Тщательное исследование и описание свойств этой популяции может оказаться полезным для понимания особенностей клеточной гетерогенности опухолей и выяснения механизмов резистентности опухоли к химиотерапии.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Проточная цитометрия и цитометрия с визуализацией осуществлялись с применением оборудования ЦКП “Протеом человека”, поддержанного Министерством образования и науки РФ (соглашение 14.621.21.0017, уникальный идентификатор проекта RFMEFI62117X0017).

### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа поддержана грантом РНФ №18-15-00360.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Воронцова Е.В., Гришанова А.Ю., Мельникова Е.В., Мухин О.В., Домникова Н.П., Ляхович В.В. (2003) Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, **136**(11), 547-549. [Vorontsova E.V., Grishanova A.Y., Mel'nikova E.V., Mukhin O.V., Domnikova N.P., Lyakhovich V.V. (2003) Bull. Exper. Biol. Med., **136**(5), 485-486.]
2. El-Awady R., Saleh E., Hashim A., Soliman N., Dallah A., Elrasheed A., Elakraa G. (2017) Front. Pharmacol., **7**, 535. DOI: 10.3389/fphar.2016.00535
3. Wu C., Alman B.A. (2008) Cancer Lett., **268**(1), 1-9.
4. Goodell M.A., Brose K., Paradis G., Conner A.S., Mulligan R.C. (1996) J. Exp. Med., **183**, 1797-1806. DOI: 10.1084/jem.183.4.1797
5. Telford W.G., Bradford J., Godfrey W., Robey R.W., Bates S.E. (2007) Stem Cells, **25**(4), 1029-1036. DOI: 10.1634/stemcells.2006-0567.
6. Richard V., Nair M.G., Santhosh Kumar T.R., Pillai M.R. (2013) BioMed Research International, Article ID 517237. DOI: 10.1155/2013/517237.
7. Суворов Р.Е., Ким Я.С., Гисина А.М., Чанг Дж.Н., Ярыгин К.Н., Лупатов А.Ю. (2018) Клеточные технологии в биологии и медицине, **3**, 157-163. [Suvorov R.E., Kim Y.S., Gisisina A.M., Chiang J.H., Yarygin K.N., Lupatov A.Y. (2018) Bull. Exper. Biol. Med., **166**(1), 135-140.]
8. Chiba T., Kita K., Zheng Y.W., Yokosuka O., Saisho H., Iwama A., Nakauchi H., Taniguchi H. (2006) Hepatology, **44**(1), 240-251.
9. Wang J., Guo L.P., Chen L.Z., Zeng Y.X., Lu S.H. (2007) Cancer Res., **67**(8), 3716-3724.
10. Ho M.M., Ng A.V., Lam S., Hung J.Y. (2007) Cancer Res., **67**(10), 4827-4833.
11. Haraguchi N., Utsunomiya T., Inoue H., Tanaka F., Mimori K., Barnard G.F., Mori M. (2006) Stem Cells, **24**(3), 506-513.
12. Burkert J., Otto W.R., Wright N.A. (2008) J. Pathol., **214**(5), 564-573.
13. Herzenberg L.A., Tung J., Moore W.A., Herzenberg L.A., Parks D.R. (2006) Nature Immunol., **7**(7), 681-685.
14. Zuba-Surma E.K., Kucia M., Abdel-Latif A., Lillard J.W. Jr., Ratajczak M.Z. (2007) Folia Histochem. Cytobiol., **45**(4), 279-290.
15. Jakubikova J., Cervi D.N., Daley J.F., Cholujo D., Ooi M.G., Klippel S., Blotta S., Leiba M., Delmore J., McMillin D., Kastritis E., Laubach J., Richardson P., Sedlak J., Anderson K.C., Mitsiades C.S. (2009) Blood, **114**(22), 954. DOI: 10.1182/blood.V114.22.954.954.
16. Jakubikova J., Adamia S., Kost-Alimova M., Klippel S., Cervi D., Daley J.F., Cholujo D., Kong S.-Y., Leiba M., Blotta S., Ooi M., Delmore J., Laubach J., Richardson P.G., Sedlak J., Anderson K.C., Mitsiades C.S. (2011) Blood, **117**(17), 4409-4419. DOI: 10.1182/blood-2010-02-267344.
17. Boesch M., Wolf D., Sopfer S. (2016) Stem Cells Int., **2016**, 1652389. DOI: 10.1155/2016/1652389.
18. Гисина А.М., Лупатов А.Ю., Каралкин П.А., Майновская О.А., Петров Л.О., Сидоров Д.В., Франк Г.А., Ярыгин К.Н. (2014) Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, **158**(7), 89-93. [Gisisina A.M., Lupatov A.Y., Karalkin P.A., Yarygin K.N., Mainovskaya O.A., Petrov L.O., Sidorov D.V., Frank G.A. (2014) Bull. Exper. Biol. Med., **158**(1), 80-83.]

Поступила в редакцию: 02. 03. 2021.  
После доработки: 10. 03. 2021.  
Принята к печати: 11. 03. 2021.

# IDENTIFICATION OF THE SIDE POPULATION ASSOCIATED WITH ATP-BINDING CASSETTE TRANSPORTERS ACTIVITY USING IMAGING FLOW CYTOMETRY

A.M. Gisisina\*, Y.S. Kim, K.N. Yarygin, A. Yu. Lupatov

Institute of Biomedical Chemistry,  
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; \*e-mail: alisa.gisisina@gmail.com

DyeCycle Violet efflux, caused by ATP-binding cassette transporters activity, was analyzed in human colorectal adenocarcinoma cell lines SW480, HT-29, Caco-2 by means of FACSAria III flow cytometer and ImageStreamX Mk II imaging flow cytometer. Along with similarity of cytometry data obtained on the two instruments, the use of imaging flow cytometry made it possible to characterize the morphology of side population cells, as well as morphology of other cell populations differing in the degree of dye accumulation. The population of cells, which are smaller than the side population cells and practically do not take the dye, is of the special interest. Probably, this population may contribute to the tumor resistance to chemotherapy.

**Key words:** imaging flow cytometry; side population; DyeCycle Violet; colorectal adenocarcinoma

**Funding.** This work was supported by the Russian Science Foundation, grant no. 18-15-00360.

Received: 02.03.2021, revised: 10.03.2021, accepted: 11.03.2021.