

## МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ДЕТЕКЦИИ ПРОЦЕССА АУТОФАГИИ В МЫШЕЧНЫХ КЛЕТКАХ

Сухарева К.С.<sup>1</sup>, Смолина Н.А.<sup>2</sup>, Головкин А.С.<sup>2</sup>, Худяков А.А.<sup>2</sup>,  
Князева А.А.<sup>1</sup>, Мишанин А.И.<sup>2</sup>, Костарева А.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение «Северо-Западный Федеральный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

### Контактная информация:

Костарева Анна Александровна  
ФГБУ «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова»  
Минздрава России  
ул. Аккурагова, д. 2, Санкт-Петербург,  
Россия, 197341.  
e-mail: akostareva@hotmail.com

Статья поступила в редакцию 10.11.2016  
и принята к печати 17.11.2016

### Резюме

**Введение.** Аутофагия — процесс, при котором компоненты клетки подвергаются деградации под действием лизосомальных ферментов, в результате чего формируется аутофагосома. В настоящее время процесс аутофагии рассматривается как одна из точек приложения ряда фармакологических подходов, в частности, при наследственной, орфанной патологии, а также при старении и сердечной недостаточности. Существенное значение для методической оценки процесса аутофагии имеет объект исследования и свойства изучаемой клеточной культуры. В данной работе проводился подбор оптимальных условий оценки процесса аутофагии в мышечных клетках мышцы линии C2C12.

**Методы.** В работе проводился подбор условий для реализации таких методов оценки аутофагии, как проточная цитометрия, иммуноцитохимия и иммуноблоттинг (Western Blot). Проводился поиск оптимальных условий пермеабиллизации клеток различными детергентами, подбор температурных условий, времени фиксации материала и компонентов лизирующих растворов.

**Результаты.** Показано, что обязательным условием раздельной экстракции белка LC3 из растворимой и нерастворимой цитоплазматической фракции является применение детергента дигитонина в концентрации 0,025%. При проведении проточной цитометрии обязательными являются фиксация образцов и сокращенное время отмывки, позволяющее сохранить оптимальное количество клеток для анализа на фоне применения детергентов. Показано, что использование трансфекции клеток плазмидой, несущей LC3, приводит к увеличению необходимого времени сывороточной депривации.

**Выводы.** Оптимизированные протоколы оценки процесса аутофагии при помощи детекции раздельных фракций белка LC3 в клетках мышечной линии C2C12 могут быть эффективно использованы при изучении фундаментальных молекулярных и клеточных механизмов развития миопатий и кардиомиопатий.

**Ключевые слова:** аутофагия, клеточная гибель, мышечные клетки

Для цитирования: Трансляционная медицина. 2016; 3 (5): 129–137.

## METHODOLOGICAL APPROACHES TO DETECTION AUTOPHAGY IN MUSCLE CELLS

Sukhareva K.S.<sup>1</sup>, Smolina N.A.<sup>2</sup>, Golovkin A.S.<sup>2</sup>, Khudyakov A.A.<sup>2</sup>,  
Knyazeva A.A.<sup>1</sup>, Mishanin A.I.<sup>2</sup>, Kostareva A.A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Peter the Great Saint-Petersburg Polytechnic University,  
Saint-Petersburg, Russia

<sup>2</sup>Federal Almazov North-West Medical Research Centre,  
Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Anna A. Kostareva,  
Federal Almazov North-West Medical  
Research Centre  
Akkuratova str. 2, Saint Petersburg, Russia,  
197341  
e-mail: akostareva@hotmail.com

Received 11 November 2016; Accepted 17  
November 2016

### Abstract

**Introduction.** Autophagy is a process, whereby components of cell undergo degradation influenced by lysosomal enzymes leading to autophagosome formation. Nowadays, autophagy is considered as one of the application point in range of pharmacological approaches, particularly, in inherited orphan diseases and also in aging, and heart failure. Object of research and properties of examined cell culture have the essential meaning for methodological evaluation of autophagy. In this work, we present selection of optimal conditions for evaluation of autophagy progress in C2C12 cell line.

**Methods.** To select the optimal approach to evaluate autophagy progress, we tested flow cytometry, immunocytochemistry, and immunoblot (Western blot). To choose the optimal conditions of cell membrane permeabilization performance various detergents, temperature conditions, time of cell fixation, and components of lysis buffer were compared.

**Results.** We report, that application of 0,025% digitonin is decisive condition to extract separate protein LC3 fractions (soluble and insoluble). Samples fixation and reduced time of washing are necessary for flow cytometry and allow to maintain optimal number of cells for analysis based on detergent application. We consider, that applying of cell transfection with constructs, carrying LC3, can lead to increase the required time of serum deprivation.

**Conclusions.** Optimized protocols for evaluation of autophagy in C2C12 cells over detection of separate fractions of LC3 can be effectively used in investigation of fundamental molecular and cellular mechanisms of myopathies and cardiomyopathies development.

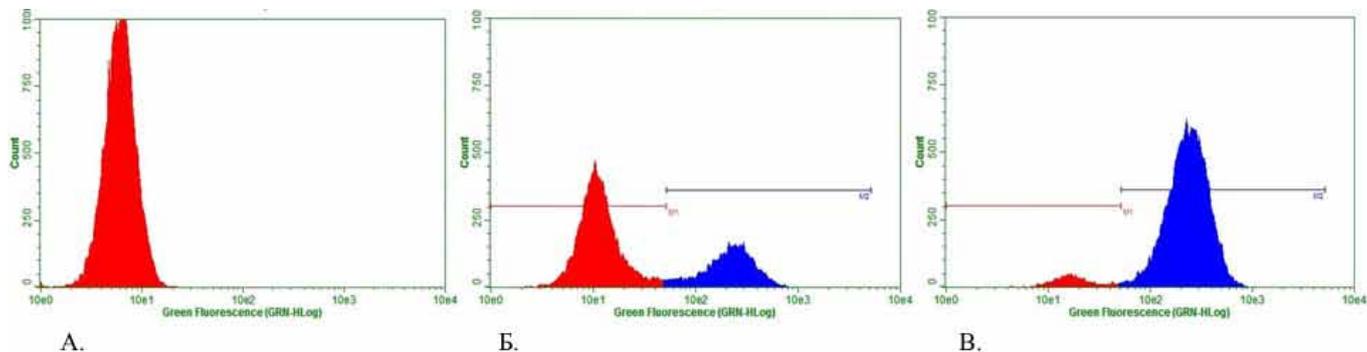
**Key words:** autophagy, cell death, muscle cell

*For citation: Translyatsionnaya meditsina = Translational Medicine. 2016; 3 (5): 129–137.*

Кардиомиопатии и миопатии — это тяжелые, чаще всего генетически-обусловленные заболевания миокарда и скелетных мышц, при которых значительно нарушается их морфологическая структура и функции, а также развиваются синдромы сердечной недостаточности и мышечной слабости [1]. Несмотря на низкую распространенность кардиомиопатий в популяции, их клиническая значимость очень велика и определяется двумя главными аспектами. Во-первых, кардиомиопатии являются наиболее частой причиной развития синдрома

внезапной сердечной смерти в молодом возрасте. В основе внезапной сердечной смерти лежат тяжелые желудочковые нарушения ритма, и наиболее часто данный синдром развивается при гипертрофической кардиомиопатии (1% в год в возрасте старше 25 лет и 5-8% в год в детском и подростковом возрасте) и при аритмогенной кардиомиопатии правого желудочка. Во-вторых, кардиомиопатии являются наиболее частой причиной развития сердечной недостаточности в детском и молодом возрасте, что приводит к необходимости применения

**Рисунок 1. Результаты пермеабиллизации разными концентрациями дигитонина без последующей фиксации клеток и влияние различных концентраций дигитонина на эффективность окраски LC3II изоформы в мышечных клетках: неокрашенные клетки (А), клетки, окрашенные анти-LC3 антителами, дигитонин 0,0025% (Б), клетки, окрашенные анти-LC3 антителами, дигитонин 0,005% (В). При использовании дигитонина 0,005% отмечается лучшее окрашивание лизосомальным красителем (лучшая пермеабиллизация и проникновение красителя внутрь клетки)**



таких высокотехнологичных методов лечения, как имплантация искусственного левого желудочка и трансплантация сердца [2]. Тяжелые формы прогрессирующих миодистрофий и дистальных миопатий также являются причинами двигательных нарушений и ранней инвалидизации пациентов. Таким образом, разработка и поиск новых подходов к лечению данной патологии являются крайне актуальными задачами современной фундаментальной и трансляционной медицины.

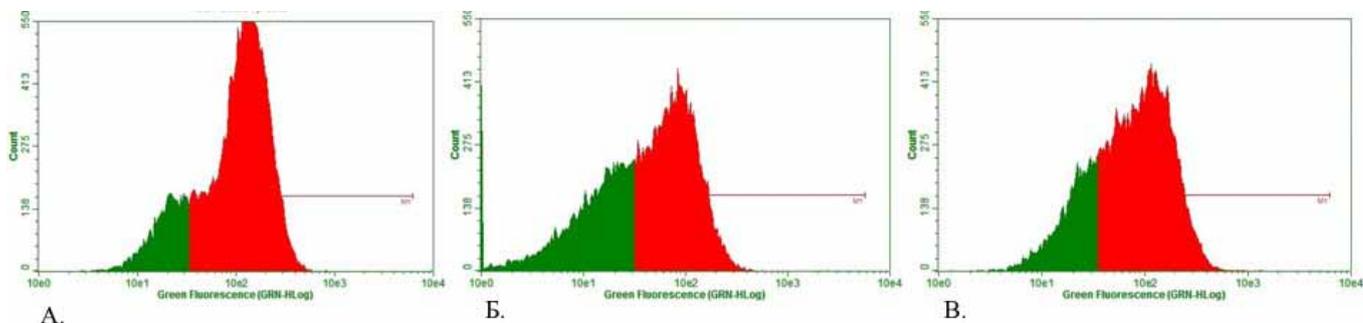
Одним из примеров универсальных внутриклеточных процессов, имеющих значение в молекулярном патогенезе кардиомиопатий и миопатий, являются процессы клеточного дыхания и продукции АТФ, а также процесс аутофагии. Кардиомиоциты и скелетные миофибриллы являются терминально дифференцированными клетками с большой долей внутриклеточных сократительных и структурных белков, а процесс аутофагии является одним их ключевых в поддержании функционирования зрелых мышечных клеток. Важная роль аутофагии определяется также необходимостью деградации патологических белковых агрегатов, которые образуются при ряде кардиомиопатий и миопатий вследствие мутаций генов структурных белков. Существуют единичные данные о положительном эффекте стимуляторов аутофагии при лечении генетически обусловленных миопатий [3][4][5]. Однако определение мишеней и молекулярных механизмов действия данных препаратов при миопатиях и кардиомиопатиях требует дальнейших исследований.

Несмотря на наличие в литературе множества методов по оценке процесса аутофагии в клеточных культурах, выбор оптимального метода, условий, концентраций препаратов и способа количе-

ственной оценки сильно зависит от типа клеточной культуры, свойств клеток, их пролиферативной способности и общего содержания белка. В связи с этим актуальными являются разработка и оптимизация информативного и эффективного метода оценки аутофагии в мышечных клетках. Нами были проведены экспериментальные исследования и отработаны такие способы оценки аутофагии в мышечных клетках линии C2C12, как проточная цитофлуориметрия (FACS), Western Blot и иммуноцитохимия. Особенностями разработанных методов является возможность отдельной оценки растворимой формы белка LC3 (LC3I) и его активированной, включенной в состав аутофагосом формы (LC3 II). Для отдельной оценки данных форм при цитофлуориметрии (FACS) и Western Blot применялся метод экстракции растворимой фракции при помощи обработки дигитонином. Для оценки избирательно LC3 II фракции при иммуноцитохимии использовалась предварительная обработка клеток раствором Tween (0,05%).

Основой для исследования аутофагии методом проточной цитометрии является протокол, опубликованный V. Kaminskyu [6]. С учетом отличного типа клеток (мышечные миобласты линии C2C12) данный протокол был оптимизирован в части используемых концентраций дигитонина при проведении пермеабиллизации, количества и длительности процесса отмывки первичных и вторичных антител, температурного режима проведения пермеабиллизации и фиксации клеток. Для визуализации клеток методом проточной цитометрии и количественной обработки результатов применялись линейные или логарифмические шкалы и регистрация параметров клеток по прямому и боковому светорассеянию. При оценке эффективной и достаточной концентрации

**Рисунок 2. Сравнительная оценка разного количества отмывок от пермеабилзирующего раствора: две отмывки после пермеабилзации (А), три отмывки после пермеабилзации (Б), четыре отмывки после пермеабилзации (В). Установлено, что три процедуры отмывки являются оптимальными и достаточными после процедуры пермеабилзации, когда удаление внутриклеточных агентов эффективно, а количество сохранившихся клеток к финальному этапу исследования достаточно**



дигитонина использовались следующие разведения: 0,001%, 0,0025%, 0,005%, 0,01%. Нами было показано, что наиболее эффективной и достаточной для проведения является концентрация — 0,005% дигитонина (Рис. 1). Учитывая необходимость многократной отмывки клеток (пермеабилзация дигитонином и отмывка внутриклеточного содержимого, отмывка от параформальдегида, отмывка от первичных и вторичных антител при окраске) и потерю до 10% клеток при каждой из них, нами была проведена серия экспериментов с разным количеством процедур отмывки от дигитонина 2, 3, 4 раза. Было установлено, что три процедуры отмывки являются оптимальными и достаточными после процедуры пермеабилзации, когда удаление внутриклеточных агентов эффективно, а количество сохранившихся клеток к финальному этапу исследования достаточно (Рис.2). При анализе литературы на предмет выбора протокола проведения пермеабилзации клеток дигитонином при исследовании аутофагии было выявлено, что часть исследователей проводит реакцию при условиях комнатной температуры, однако большинство — на льду [6, 7, 8, 9, 10]. Подходы к длительности пермеабилзации в опубликованной литературе также разнятся, однако наиболее часто процедура проводится в течении 5 мин. Таким образом, в дальнейшем все эксперименты по использованию дигитонина проводились на льду в течении 5 мин. Было установлено, что использование 0,001% раствора дигитонина не оказывает достаточного пермеабиллирующего эффекта; 0,0025% — не дает стабильных результатов (при проведении серий экспериментов низкая сходимость); 0,01% — обладает эффектом, близким к цитолитическому; 0,025% — демонстрировал стабильные результаты и достаточную эффективность.

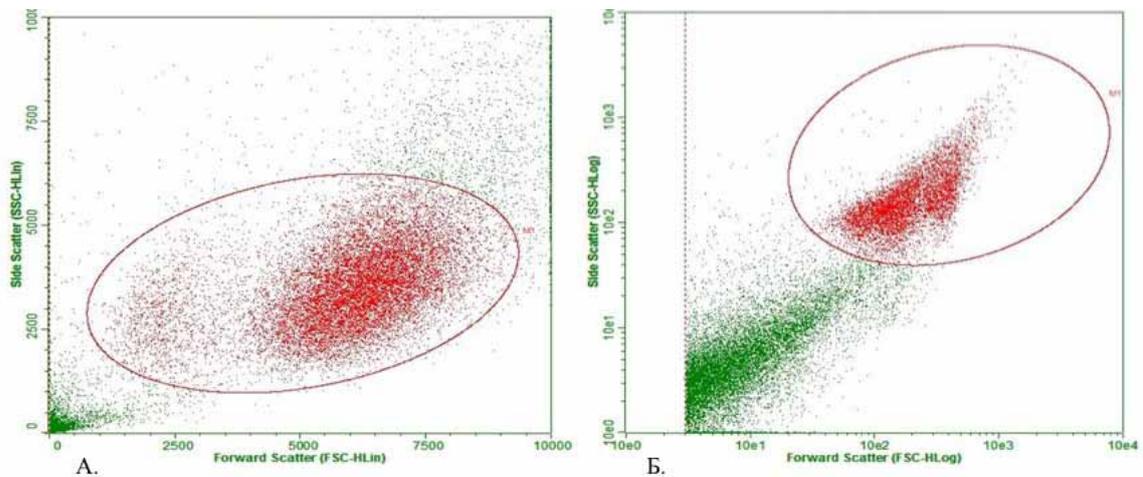
Теоретической предпосылкой к отказу проведения процедуры фиксации клеток после прове-

дения пермеабилзации было желание уменьшить неизбежные потери клеточной массы, связанные с проведением дополнительных процедур отмывки после фиксации. Однако, полученные результаты продемонстрировали целесообразность проведения фиксации клеток после пермеабилзации и отмывки и формирование двух пулов: позитивных и негативных по LC3 клеток. При этом в случае фиксации такой явной гетерогенности не отмечалось. Таким образом, наиболее эффективным был признан способ предварительной фиксации клеток 4% раствором PFA после пермеабилзации дигитонином и перед процессом окраски антителами.

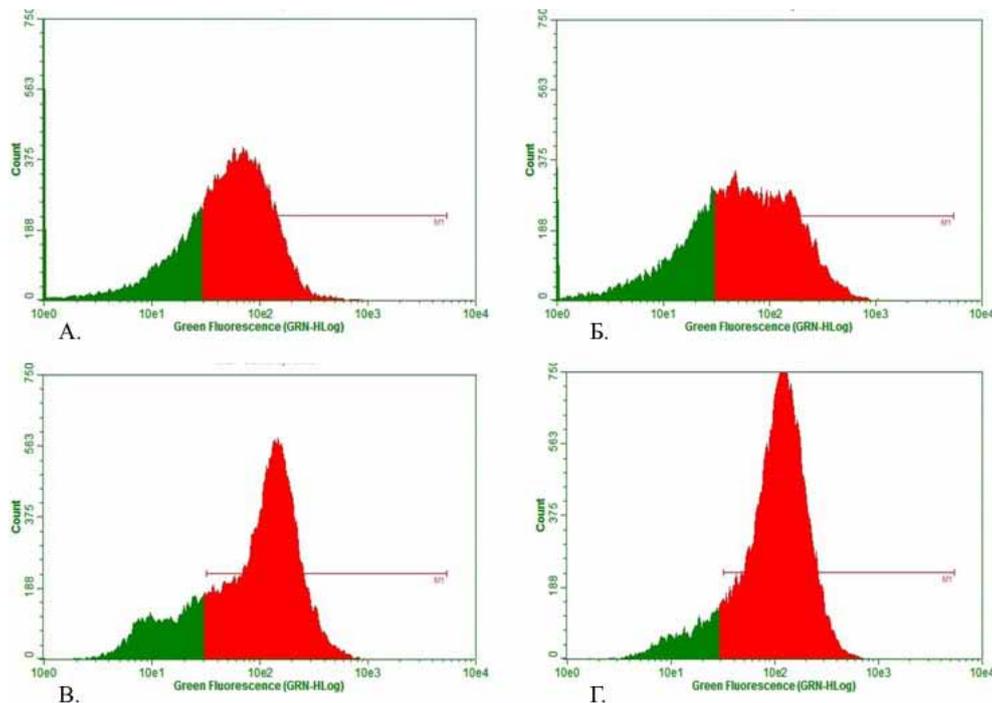
В работе были использованы первичные антитела Anti-LC3 pAb (purified IgG/rabbit) (MBL, Japan) и вторичные антитела antirabbit AF488. Рабочими разведениями антител были 1:200. Использовались различные комбинации с объемами в 5, 10, 20, 40 мкл. Было установлено, что эффективным и достаточным является использование первичных и вторичных антител в объеме 10 мкл, разведение 1:200.

В большинстве случаев для визуализации культур клеток при проточной лазерной цитометрии используются логарифмические шкалы при построении графиков по прямому и боковому светорассеянию. Этот метод позволяет минимизировать «потери» клеток при их детекции, а также уменьшить количество «шума» и дедриса. Однако в этом случае не представляется возможным характеризовать клетки по размеру и гранулярности (внутреннему содержимому). В то же время предполагается, что эти характеристики клеток могут оказаться важными для оценки аутофагии, при которой морфология клеток может меняться значительно. После проведения сравнительных тестов эффективности визуализации в логарифмических и линейных шкалах (позволяющих оценить размер и гранулярность)

**Рисунок 3.** Примеры визуализации клеток по прямому и боковому светорассеянию в линейных (А) и логарифмических (Б) шкалах. Отчетливо видна гетерогенность клеток по размеру (forward scatter) при линейном построении шкал



**Рисунок 4.** Пример результатов окрашивания клеток с применением анти-LC3 антител по уточненному протоколу при различной длительности депривации с использованием метода проточной лазерной цитометрии: контроль без депривации (А), депривация 1 час (Б), депривация 4 часа (В), депривация 5 часов (Г)



были сделаны выводы о целесообразности использования линейных шкал при построении графиков по прямому и боковому светорассеянию (Рис.3).

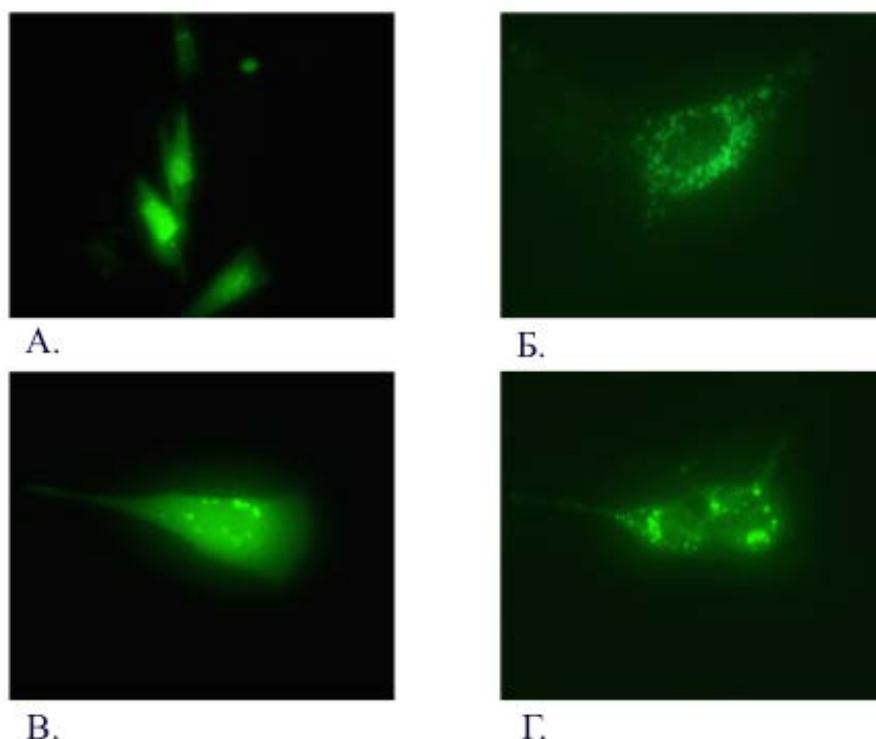
Для оценки эффективного и показательного периода депривации клеток — «голодания» — были проведены серии экспериментов с оценкой временных точек 1, 4 и 5 часов (Рис. 4). Было установлено, что уровень аутофагии через 1 час «голодания» не отличался от такового в контрольных образцах. Продол-

жительности эксперимента в 4 и 5 часов были наиболее репрезентативны и воспроизводимы.

*Уточненный протокол пробоподготовки и окраски клеток C2C12 для оценки аутофагии методом проточной лазерной цитометрии*

1. Снятые с культурального пластика трипсином клетки ресуспендировать в фосфатно-солевом буфере (PBS) + 2% эмбриональной телячьей сыворотки.

**Рисунок 5. Пример результатов окрашивания клеток с применением анти-LC3 антител с предварительной пермеабиллизацией дигитонином: без предварительной пермеабиллизации (А), пермеабиллизация 0.025% Digitonin/PBS (Б), пермеабиллизация 0.05% Tween/PBS(В), 0.005% Digitonin/PBS (Г)**



2. Отмывка: центрифугировать в течение 6 мин. при 1,0 gcf. Удалить надосадочную жидкость. Ресуспендировать осадок в 50 мкл PBS.

3. Пермеабиллизация дигитонином: дигитонин 0,005% 100 мкл внести в каждую пробирку с ресуспендированными клетками. Инкубировать 5 мин. на льду.

4. Внести 1000 мкл PBS. Отмывка (см. п.2) 3 раза.

5. Фиксация: параформальдегид 4% 100 мкл внести в каждую пробирку с ресуспендированными в 50 мкл PBS клетками. Инкубировать 20 мин. при комнатной температуре.

6. Отмывка (см. п. 4) 2 раза.

7. Окраска первичными антителами. Антитела в разведении 1:200 добавлять в количестве 10 мкл на пробу. Инкубировать 30 мин. при комнатной температуре.

8. Отмывка (см. п. 4) 2 раза.

9. Окраска вторичными антителами в разведении 1:200 в количестве 10 мкл на пробу. Инкубировать 15 мин. при комнатной температуре в темноте.

10. Ресуспендировать клетки в 300 мкл PBS.

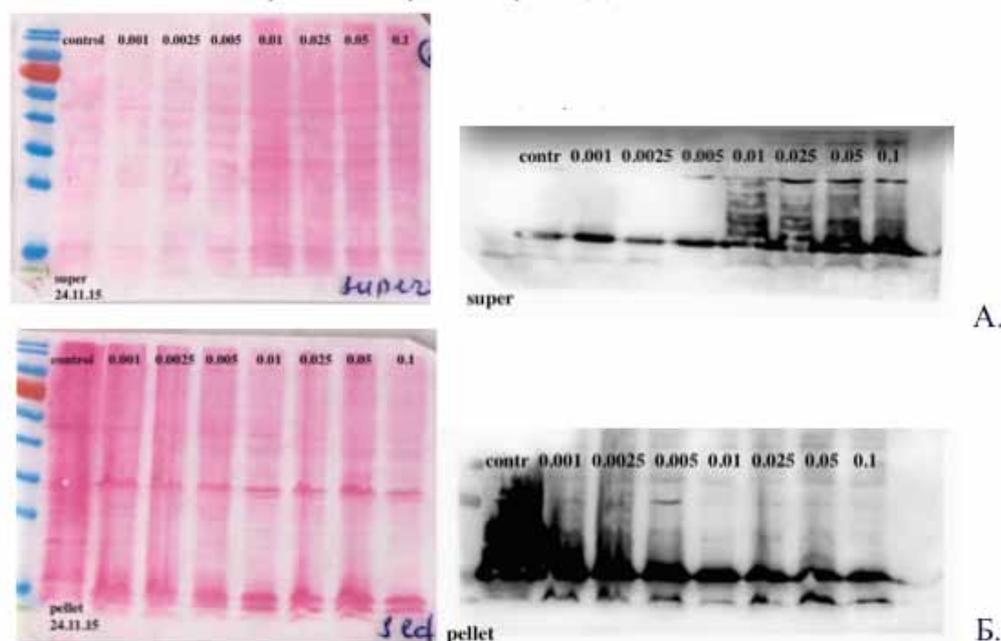
11. Цитометрия: выделить популяции клеток по прямому и боковому светорассеянию в линейных шкалах. Собирать для дальнейшего анализа не менее 5000 событий.

С учетом результатов, полученных при оптимизации метода проточной цитометрии в отношении LC3I и LC3II, при оптимизации метода иммуноокрашивания также использовался подход с предварительной обработкой клеток C2C12 различными концентрациями мягких детергентов. В качестве детергентов использовались следующие концентрации дигитонина: 0,005%, 0,025%, а также Tween/PBS 0,05%. Отработка условий действия детергентов проводилась с течение 3-5 мин. в условиях комнатной температуры либо на льду. Индукция аутофагии и подбор оптимального для анализа времени депривации проводились в течение 3-8 часов в бессывороточном растворе среды EBSS (Earle's Balanced Salt Solution). Фиксация клеток проводилась с помощью 4% раствора PFA после пермеабиллизации детергентом в течение 10 мин при температуре 4°C. Оценку аутофагии возможно проводить либо путем окраски анти- LC3 антителами, либо после трансфекции LC3-GFP плазмидой при помощи липофектамина (Рис. 5).

*Уточненный протокол пробоподготовки и окраски клеток C2C12 для оценки аутофагии методом иммуноцитохимии*

1. Депривация (голодание) клеток линии C2C12 в течение 4 часов (8 часов для клеток, трансфеци-

**Рисунок 6. Окраска общего белка и LC3 красителем Ронсеау в растворимой и нерастворимой фракциях после обработки раствором дигитонина: растворимая фракция после экстракции с применением раствора дигитонина разных концентраций (А), нерастворимая фракция после экстракции с применением раствора дигитонина разных концентраций (Б)**



А.

Б.

рованных LC3-GFP) путем замены сывороточной среды на EBSS бессывороточный буфер.

2. Отмывка PBS в течение 5 мин. 3 раза.
3. Пермеабилзация раствором 0,005% дигитонина 5 мин. при температуре при температуре 4°C.
4. Отмывка в PBS 5 мин. 3 раза.
5. Фиксация в растворе 4% PFA в течение 10 мин. при температуре 4°C.
6. Отмывка (см. п. 4). 3 раза.
7. Окраска первичными антителами (анти-LC3) в разведении 1:200. Инкубировать 1 ч. 30 мин. при комнатной температуре.
8. Отмывка (см. п. 4) 3 раза.
9. Окраска вторичными антителами в разведении 1:200 Инкубировать 30 мин. при комнатной температуре в темноте.
10. Отмывка (см. п. 4) 3 раза.
11. В случае применения прямой трансфекции LC3-GFP плазмиды (трансфекция при помощи липофектамина), начиная с п. 7, может быть проведена прямая иммунофлуоресценция клеток.

#### *Оценка процесса аутофагии методом Western blot*

С учетом результатов, полученных при оптимизации метода проточной цитометрии и скорее иммуноцитохимии с детекцией LC3I и LC3II изоформ, при оптимизации метода Western blot также использовался подход с предварительной об-

работкой клеток C2C12 различными концентрациями дигитонина для разделения растворимой и нерастворимой фракций белка LC3. Использовались следующие концентрации дигитонина: 0,1%, 0,05%, 0,025%, 0,01%, 0,005%, 0,0025%, 0,001%. В результате экстракции при помощи дигитонина растворимой белковой фракции по мере увеличения концентрации дигитонина увеличивалась концентрация белка в растворимой фракции (Рис. 6А). При последующей экстракции нерастворимой фракции белка, содержащей основную часть LC3II-изоформы, по мере увеличения концентрации дигитонина концентрация белка в нерастворимой фракции уменьшалась (Рис.6 Б). Для экстракции преимущественно нерастворимой части белков использовался стандартный буфер для радиоиммунопреципитации (RIPA) с модификацией нескольких компонентов для повышения растворимости белков (1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 1% SDS). При окраске с использованием анти-LC3 антител была получена сходная картина, соответствующая различному содержанию белка LC3 в растворимой и нерастворимой фракциях. В результате подбора различных условий обработки детергентами и изменения длительности и температуры экстракции белков был разработан наиболее оптимальный протокол метода Western blot с анти-LC3 антителами для определения процесса аутофагии в клетках мышечной линии C2C12.

*Уточненный протокол пробоподготовки и окраски белкового экстракта клеток линии C2C12 для оценки аутофагии методом Western blot*

1. Снятые с культурального пластика трипсином клетки суспензировать в PBS.
2. Отмывка: центрифугировать в течение 6 мин. при 1,0 gcf. Удалить надосадочную жидкость. Ресуспензировать осадок в 50 мкл PBS.
3. Пермеабиллизация 0.005% раствором дигитонина в течение 5 мин. на льду.
4. Центрифугировать 3 мин. при 3,5 gcf, собрать надосадочную жидкость в качестве растворимой фракции, содержащей преимущественно LC3I изоформу.
5. Обработать осадок буфером RIPA Autophagy (лизирующий буфер для экстракции нерастворимой фракции белков) и использовать в последующем в соответствии со стандартным протоколом методики Western blot в качестве нерастворимой фракции, содержащей преимущественно LC3II форму.

Представленные уточненные протоколы пробоподготовки и окраски клеток мышечной линии C2C12 анти-LC3 антителами могут быть использованы для дальнейшей оценки процесса аутофагии в скелетно-мышечных клетках и клетках миокарда, а также в мышечной ткани и ткани миокарда. Ключевым условием пробоподготовки и экстракции белка из мышечных и миокардиальных клеток для последующей оценки методом проточной лазерной цитометрии, иммуноцитохимии и Western blot является эффективное разделение растворимой цитоплазматической, не связанной с лизисомальными мембранами фракции белка LC3 (LC3I), и его активированной, включенной в состав аутофагосом формы (LC3 II). Для раздельной оценки данных фракций как при иммуноцитохимии, иммуноцитометрии (FACS), так и при анализе методом Western Blot могут эффективно применяться различные детергенты, в частности, метод экстракции растворимой фракции при помощи обработки дигитонином. Для оценки эффективной экстракции нерастворимой фракции белка LC3 (LC3 II) ключевым является увеличение экстрагирующей способности буфера путем включения в состав 1% SDS либо 2% Triton-X100. Соблюдение представленных методических подходов позволяет эффективно оценивать процесс аутофагии с применением анти-LC3 антител, ингибиторов, блокаторов и стимуляторов процесса аутофагии в культурах мышечных клеток.

**Благодарность:** Представленные в работе данные были получены при поддержке гранта Российского Научного Фонда, соглашение 14-15-00745.

#### Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

#### Список литературы / References

1. Elliott P, Andersson B, Arbustini E et al. Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society Of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur Heart J.* 2008; 29(2):270-276.
2. Vanderpluym C, Graham D, Almond C et al. Survival in patients removed from the heart transplant waiting list before receiving a transplant. *J Heart Lung Transplant.* 2014; 33(3):261-269.
3. Bhuiyan M, Pattison J, Osinska H et al. Enhanced autophagy ameliorates cardiac proteinopathy. *J Clin Invest.* 2013; 123(12):5284-5297.
4. De Palma C, Morisi F, Cheli S et al. Autophagy as a new therapeutic target in Duchenne muscular dystrophy. *Cell Death Dis.* 2012; 3:e418.
5. Jimenez R, Kubli D, Gustafsson A. Autophagy and Mitophagy in the Myocardium: Therapeutic Potential and Concerns. *Br J Pharmacol.* 2013; 171(8):1907-1916.
6. Kaminsky V, Abdi A, Zhivotovsky B. A quantitative assay for the monitoring of autophagosome accumulation in different phases of the cell cycle. *Autophagy.* 2011; 7 (1):83–90.
7. Aits S, Jäättelä M, Nylandsted J. Methods for the quantification of lysosomal membrane permeabilization: a hallmark of lysosomal cell death. *Methods Cell Biol.* 2015; 126:261–85.
8. Gottlieb R, Andres A, Sin J et al. Untangling autophagy measurements. *All Fluxed Up. Circ. Res.* 2015; 116:504–515.
9. Agholme L, Agnello M, Agostinis P et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy.* 2012; 8(4):445–544.
10. Puleston D, Phadwal K, Watson A et al. Techniques for the Detection of Autophagy in Primary Mammalian Cells. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2015(9).

#### Информация об авторах:

Сухарева Ксения Сергеевна; бакалавр ФГАОУ ВО «СПбПУ»;

Смолина Наталья Александровна; к.б.н., н.с. Института Молекулярной Биологии и Генетики, ФГБУ «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Головкин Алексей Сергеевич; д.м.н., с.н.с. Института Молекулярной Биологии и Генетики, ФГБУ «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Худяков Александр Александрович; к.б.н., н.с. Института Молекулярной Биологии и Генетики, ФГБУ «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Князева Анастасия Алексеевна; магистр ФГАОУ ВО «СПбПУ»;

Мишанин Александр Игоревич, аспирант ФГБУ «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Костарева Анна Александровна; к.м.н., директор Института Молекулярной Биологии и Генетики, ФГБУ «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России.

**Author information:**

Ksenia S. Sukhareva, bachelor student Peter the Great Saint-Petersburg Polytechnic University;

Natalia A. Smolina, PhD, researcher Institute of Molecular Biology and Genetics, Federal Almazov North-West Medical Research Centre;

Alexey S. Golovkin, MD, senior researcher, Institute of Molecular Biology and Genetics, Federal Almazov North-West Medical Research Centre;

Alexandr A. Khudyakov, PhD, researcher, Institute of Molecular Biology and Genetics, Federal Almazov North-West Medical Research Centre;

Anastasia A. Knyazeva, master student Peter the Great Saint-Petersburg Polytechnic University;

Alexandr I. Mishanin, PhD student, Institute of Molecular Biology and Genetics, Federal Almazov North-West Medical Research Centre;

Anna A. Kostareva, MD, Director of Institute of Molecular Biology and Genetics, Federal Almazov North-West Medical Research Centre.