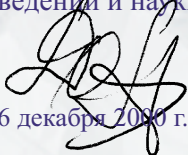


МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

СОГЛАСОВАНО

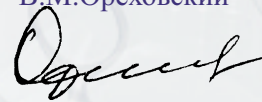
Заместитель начальника
Главного управления кадровой политики,
учебных заведений и науки Н.И. Доста



26 декабря 2000 г.

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель
министра здравоохранения
В.М.Ореховский



26 декабря 2000 г.

Регистрационный № 173-0012

**МЕТОДЫ ОЦЕНКИ
СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ
ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ**

Минск 2000

[Перейти к оглавлению](#)

Учреждение-разработчик: НИИ гематологии и переливания крови

Авторы: А.И. Свирновский, С.В. Шелег, Т.И. Шиманская, И.Н. Медведь, И.А. Радюк, А.В. Бакун, И.Б. Тарас, Э.Л. Свирновская, О.В. Ковалева, Т.В. Авхукова, С.А. Григорович

Рецензент: д-р мед. наук М.П. Потапнев

В настоящих методических рекомендациях представлены в комплексе информативные методы изучения структурно-функциональных свойств лимфоцитов, которые характеризуют их фундаментальные признаки (морфология ядра и цитоплазмы, стабильность хромосомного аппарата, способность к генерации активных форм кислорода и апоптозу) в различных условиях. Изменения этих свойств регистрируются при самых разнообразных воздействиях на клетки как *in vivo*, так и *in vitro*, что позволяет использовать их при оценке предпатологических состояний, возникающих непосредственно в организме, и рекомендовать использование лимфоцитов как тест-клеток для изучения предполагаемого влияния на организм факторов окружающей среды, лекарственных препаратов, определения индивидуальной чувствительности к действию повреждающих агентов.

Рекомендации предназначены для специалистов в области гематологии, иммунологии, лабораторной диагностики, медицинской экологии, фармакологии.

Методические рекомендации утверждены Министерством здравоохранения Республики Беларусь в качестве официального документа.

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	4
1. УГЛУБЛЕННЫЙ АНАЛИЗ МОРФОЛОГИИ ЛИМФОЦИТОВ	6
1.1. Принцип метода	6
1.2. Составление лимфоцитограммы	7
1.3. Анализ результатов	7
2. ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЛИМФОЦИТОВ	11
2.1. Принцип анализа	11
2.2. Методика цитогенетического исследования	13
2.3. Анализ результатов	15
3. ГЕНЕРАЦИЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В ЛИМФОЦИТАХ	20
3.1. Принцип метода	20
3.2. Методика измерения люминолзависимой хемилюминесценции	23
3.3. Анализ результатов	24
4. ОЦЕНКА АПОПТОТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В ЛИМФОЦИТАХ	38
4.1. Принцип метода оценки апоптоза по фрагментации ДНК	38
4.2. Принцип детекции апоптотических клеток по содержанию ДНК	42
4.3. Выявление разрывов в ДНК апоптотических клеток <i>in situ</i>	46
4.4. Регистрация конденсации и фрагментации хроматина апоптотических клеток с помощью флуоресцентной микроскопии	46
4.5. Учет апоптотических клеток по другим специфическим признакам	50
4.6. Принцип МТТ-теста	53
4.6.1. Методика выполнения МТТ-теста	53
4.7. Анализ результатов	55
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	59

ВВЕДЕНИЕ

Поиски дополнительных объективных критериев для оценки состояния организма в различных условиях его существования (действие факторов окружающей среды, нарушение адаптационных процессов, наличие различной патологии) являются актуальным направлением медико-биологических исследований. При учете роли лимфоидной системы в организме и практически неисчерпаемых возможностях анализа лимфоцитов, которые отвечают на нарушение гомеостаза организма изменением структурного и функционального состояния, можно полагать, что эти клетки, часть которых циркулирует в периферической крови, являются подходящими кандидатами для определения реакций организма на те или иные воздействия. При этом существенным представляется не только и не столько констатация нарушений по общепринятым показателям (количество лимфоцитов, соотношение их субпопуляций, продукция антител, генерация цитотоксических и других эффекторных клеток и т.д.), что достаточно хорошо изучено при ряде заболеваний, но и исследование отдельных фундаментальных свойств клеток, изменчивость которых может лежать в основе последующих клинических проявлений дисрегуляции процессов кроветворения и иммунитета и рассматриваться как ранняя биоиндикация формирования адаптационных и патологических процессов в организме.

Параллельно лимфоциты могут использоваться как тест-клетки для предсказания чувствительности организма к биологическим, физическим и химическим воздействиям, с которыми организм может сталкиваться в процессе жизнедеятельности (поллютанты, ионизирующая радиация, лекарственные препараты, профессиональные факторы и др.).

В роли информативных показателей состояния процессов, которые в конечном итоге в последующем связаны с обеспечением выполнения специфических функций, могут рассматриваться такие свойства лимфоцитов, как структура их ядра и цитоплазмы, стабильность генетического аппарата клетки, генерация активных форм кислорода и способность вступать на путь запрограммированной клеточной гибели.

Приводится описание методик, которые могут использоваться при выполнении указанных исследований. Данная работа ставит своей целью помощь врачу и исследователю в выборе адекватных методов детекции структурно-функциональных изменений в лимфоцитах.

1. УГЛУБЛЕННЫЙ АНАЛИЗ МОРФОЛОГИИ ЛИМФОЦИТОВ

1.1. Принцип метода

Высокая чувствительность лимфоидной ткани к действию разнообразных повреждающих факторов, с одной стороны, и отсутствие регистрируемых специфических особенностей или малая выраженность изменений при недостаточно высокой интенсивности воздействия этих факторов, с другой стороны, создают ситуацию, в которой интерпретация результатов наиболее распространенного вида обследования крови (общий анализ крови) при мониторинге населения, проживающего в различных экологических условиях, или лиц с предполагаемой патологией различных систем организма или с уже развившимися заболеваниями не может быть однозначной. Поиск резервных возможностей, которые бы давали дополнительную информацию, перспективен для скрининговых и диагностических исследований. В частности, в роли таких показателей можно использовать морфологические признаки лимфоцитов крови, которым при обычном анализе не уделяется достаточно внимания и которые не принимаются во внимание при автоматизированном анализе крови. С этой целью составляют лимфоцитограмму, основанную на дифференцированном учете величины клеток, структуры их ядер, а также тинкториальных свойств цитоплазмы, ее формы, размеров, наличия включений.

1.2. Составление лимфоцитограммы

Для выполнения детализированного морфологического анализа лимфоцитов пригодны препараты крови, приготовленные для подсчета лейкоцитарной формулы на предметных стеклах, с последующей стандартной фиксацией и окраской. Просматривают 100 лимфоцитов, выделяя большие, малые и средние лимфоциты и плазматические клетки. При этом отмечают количество клеток с пикнотичными, отростчатыми, расщепленными, ядрышкосодержащими и вакуолизированными ядрами, а также клетки с двумя ядрами и микроядрами (в последнем случае более информативным может оказаться просмотр 1000 лимфоцитов). Одновременно учитывают количество клеток с базофильной, вытянутой, отростчатой, вакуолизированной и гранулярной цитоплазмой.

1.3. Анализ результатов

В связи с отсутствием подробных исходных данных рассчитаны показатели для составления лимфоцитограммы практически здоровых людей, в качестве которых были выбраны доноры крови (см. табл. 1).

Целесообразность использования предлагаемой схемы анализа морфологии лимфоцитов для выявления изменений их структуры при различных состояниях подтверждена при сопоставлении результатов исследований лимфоцитограммы здоровых людей и лиц, подвергшихся воздействию неблагоприятных факторов окружающей среды. Прежде всего установлено, что при стимуляции иммунной системы у здоровых лиц (доноры, которых иммунизировали стафилококковым анатоксином для получения антистафилококковой плазмы на Республиканской станции переливания крови) в их крови увеличивается содержания малых лимфоцитов при снижении числа средних и больших при параллельном увеличении содержания гранулярных лимфоцитов и уменьшении числа широкоплазменных. Различия в содержании плазматических клеток, клеток с отростчатым, расщепленным, вакуолизированным ядром, двуядерных клеток и клеток с ядрышками у интактных и иммунизированных доноров не зарегистрированы. Не обнаружены и изменения в содержании клеток с вытянутой, базофильной, вакуолизированной или отростчатой цитоплазмой (табл. 1).

Лимфоцитограмма различных групп обследованных лиц

Исследуемый показатель	Количество клеток, %		
	доноры	иммунизированные доноры	ликвидаторы
<i>лимфоциты</i> : малые	28,4 ± 1,1	33,8 ± 0,8*	29,1 ± 0,8
средние	49,0 ± 1,0	45,4 ± 0,7*	44,5 ± 0,6*
большие	22,5 ± 0,7	20,4 ± 0,5*	26,8 ± 0,5*
<i>плазматические клетки</i>	0,13 ± 0,06	0,25 ± 0,10	0,50 ± 0,10*
<i>ядро</i> : оторстчатое	5,8 ± 0,4	6,6 ± 0,3	7,9 ± 0,3*
двухядерное	0,03 ± 0,02	0,08 ± 0,03	0,54 ± 0,09*
расщепленное	0,32 ± 0,07	0,32 ± 0,10	1,59 ± 0,13*
вакуолизированное	0,4 ± 0,1	0,6 ± 0,1	1,2 ± 0,1*
с микроядрами	< 0,1	< 0,1	0,11 ± 0,03
с ядрышками	6,8 ± 0,7	6,0 ± 0,4	11,9 ± 0,6*
<i>цитоплазма</i> : вытянутая	0,7 ± 0,2	0,6 ± 0,2	1,7 ± 0,2*
широкая	9,2 ± 0,8	6,5 ± 0,4*	10,7 ± 0,5
гранулярная	7,5 ± 0,7	14,4 ± 0,5*	18,7 ± 0,7*
базофильная	13,2 ± 1,0	12,4 ± 0,7	11,9 ± 0,6
вакуолизированная	1,5 ± 0,3	1,8 ± 0,2	5,2 ± 0,3*
оторстчатая	6,7 ± 0,4	6,3 ± 0,2	7,3 ± 0,3

*достоверные изменения

Вместе с тем для лимфоцитограммы участников ликвидации последствий аварии на ЧАЭС по сравнению с донорами крови характерно снижение числа средних лимфоцитов и увеличение количества больших и гранулярных лимфоцитов, плазматических клеток, клеток с измененными контурами ядер, вакуолизированными ядрами, с ядрышкосодержащими ядрами, с микроядрами, клеток с вытянутой и вакуолизированной цитоплазмой (табл 1). При этом следует учесть, что изменение структуры и контуров ядер лимфоцитов (двухядерные лимфоциты, лимфоциты с расщепленными, отростчатыми и вакуолизированными ядрами) обнаружено также в процессе обследования, проводимого НИКИ радиационной медицины и эндокринологии и Белорусским комитетом «Дети Чернобыля», у взрослых и детей, проживающих в экологически неблагоприятных районах. Важно подчеркнуть, что если колебания в числе малых (снижение), широкоплазменных (увеличение) и гранулярных (увеличение) лимфоцитов наблюдаются при острых респираторных заболеваниях, то изменение структуры и контуров ядер лимфоцитов у лиц, подвергшихся воздействию неблагоприятных факторов окружающей среды, не зависит от наличия имеющихся у них хронических заболеваний и не связано с наличием отклонений в рутинной гемограмме. Следовательно, накопление лимфоцитов с измененными ядрами в крови отдельных групп лиц можно рассматривать как критерий экологического неблагополучия.

2. ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЛИМФОЦИТОВ

2.1. Принцип анализа

Выявление хромосомных aberrаций, индуцированных различными генотоксическими влияниями, основано на способности морфологически зрелых лимфоцитов, в отличие от других зрелых клеток крови, делиться в ответ на действие митогенных стимулов при помещении их в соответствующую питательную среду. Для накопления клеток в стадии метафазы, на которой видны отдельные хромосомы, необходимо внесение в среду культивирования митотического ингибитора. Метафазные клетки затем обрабатывают гипотоническим раствором таким образом, чтобы обеспечить набухание клеток. Последующая фиксация в суспензии дегидратирует клетки и «закаливает» хромосомы. Суспензию клеток переносят на предметные стекла таким образом, чтобы обеспечить соответствующее расположение метафазных хромосом до их окраски. Хромосомный анализ включает определение числа и структуры хромосом. Более детально структура хромосом может быть оценена после ферментативной обработки препаратов с целью последующего кариотипирования..

Упрощенный вариант обнаружения цитогенетических нарушений в лимфоцитах связан с подсчетом микроядер, наличие которых обусловлено невключением в основные ядра дочерних клеток во время клеточного деления отдельных хромосом или хромосомных фрагментов. Фактически микроядра являются индикаторами кластогенных или анеугенных эффектов, которые обнаруживаются на микроскопических препаратах без детального анализа хромосом. При культивировании клеток с цитохалазином благодаря индуцированному им цитокинетическому блоку можно учесть те клетки, которые завершили одно деление ядер без деления цитоплазмы (бинуклеарные клетки), тогда как подсчет микроядер в мононуклеарных лимфоцитах не связывает зависимость экспрессии микроядер с кинетикой клеточного деления.

2.2. Методика цитогенетического исследования

Для проведения анализа хромосом лимфоцитов во флаконы, содержащие по 5 мл питательной среды RPMI 1640 с 10% эмбриональной телячьей сыворотки или сыворотки крови человека группы АВ (IV), 0,1% L-глутамин и антибиотики, вносят по 0,5 мл крови из расчета 1–2 млн клеток/мл (культивирование осуществляют в стерильных условиях). В качестве митогена используют смесь фитогемагглютинаина Р (ФГА-Р) и фитогемагглютинаина М (ФГА-М). Культивируют клетки в течение 48–72 ч (при анализе преимущественно нестабильных aberrаций — в течение 48 ч) в атмосфере 5% углекислого газа в воздухе. На последний час культивирования во флаконы вносят колцемид в конечной концентрации 10 мкг/мл. После культивирования клетки переносят в 0,075 моль хлорида калия и выдерживают в течение 10 мин, затем трижды обрабатывают фиксатором (этанол: уксусная кислота 3:1). После последнего центрифугирования взвесь наносят на холодные и влажные предметные стекла. Препараты высушивают на воздухе, затем окрашивают по Романовскому — Гимзе. При необходимости для выявления исчерченности хромосом и анализа стабильных хромосомных aberrаций препараты предварительно обрабатывают трипсином. Под микроскопом при увеличении 90×10 оценивают количество и морфологию хромосом.

Методы оценки структурно-функционального состояния лимфоцитов периферической крови

Для определения микроядер в лимфоцитах 5 капель крови вносят в культуральные планшеты, содержащие по 1 мл среды с 20% эмбриональной телячьей сыворотки, 2,5% ФГА, 2 г/л бикарбоната натрия и смесь антибиотиков, и культивируют в атмосфере с 5% углекислого газа. В часть проб на 44-м часу инкубации вносят цитохалазин В, растворенный в диметилсульфоксиде (основной раствор с концентрацией 100 мкг/мл), до конечной концентрации 5 мкг/мл. Еще через 24 ч культуры обрабатывают 0,125 моль хлоридом калия в течение 6 мин, первым фиксирующим раствором (этанол, 0,9% хлорид натрия и ледяная уксусная кислота в соотношении 12:13:1) в течение 8 мин, вторым фиксирующим раствором (этанол и ледяная уксусная кислота в соотношении 4:1) в течение 6 мин. Фиксация вторым фиксирующим раствором проводится трижды с последующим центрифугированием в течение 20–30 с. Приготовленные на стекле препараты окрашивают по Гимзе, разведенной фосфатным буфером. Микроядра подсчитывают в поли-, би- и мононуклеарных клетках при увеличении $\times 500$.

2.3. Анализ результатов

При определении чувствительности генетического аппарата лимфоцитов к повреждающему действию рентгеновского облучения по индукции числа клеток с хромосомными aberrациями и микроядрами показано, что после облучения рентгеновскими лучами *in vitro* в дозе 0,5 Гр отчетливо регистрируется увеличение количества клеток с aberrациями хромосом до 3,6%, при этом количество клеток с дицентрическими хромосомами составляет 1,3%, парные фрагменты обнаружены приблизительно в таком же количестве клеток. Количество мононуклеарных клеток с микроядрами в облученных культурах достигало 2,2%, количество бинуклеарных клеток с микроядрами составляло 4,0%. Общее количество aberrаций клеток при облучении оказывается близким количеству бинуклеарных клеток с микроядрами, но превосходит количество мононуклеарных клеток с микроядрами. Дицентрические хромосомы и парные фрагменты обнаруживались реже, чем микроядра. При увеличении дозы рентгеновского облучения лимфоцитов до 5 Гр наблюдали дозозависимое нарастание числа цитогенетических нарушений. Интересно отметить, что лимфоциты доноров крови после иммунизации стафилококковым анатоксином были более чувствительны к кластогенному или анеугенному действию ионизирующей радиации, чем аналогичные клетки из крови интактных доноров. Контакт клеток *in vitro* с химическими соединениями (дексаметазон, флударабин) приводил к менее выраженному увеличению числа микроядер в культивируемых лимфоцитах.

Вариабельность индукции с помощью физических или химических факторов aberrаций хромосом (в том числе и появления микроядер) в лимфоцитах *in vitro* может быть сопоставлена с индивидуальной чувствительностью к действию ионизирующей радиации или цитостатических препаратов (лучевая и химиотерапия) при опухолевых процессах различных локализаций, к проживанию в экологически неблагоприятных районах.

Результаты цитогенетических исследований лимфоцитов лиц, принимавших участие в ликвидации последствий аварии на ЧАЭС

Группа обследованных лиц	Время работы, год	Время обследования, год	Количество лиц	Количество проанализированных метафаз
1. Ликвидаторы	1986	1989–1990	57	5309
2. Ликвидаторы	1986	1990–1991	66	6489
3. Ликвидаторы	1986	1991–1992	48	6689
4. Ликвидаторы	1987	1990–1991	39	3736
5. Ликвидаторы	1987	1991–1992	6	700
6. Доноры крови		1989–1992	30	3600
7. Ликвидаторы	1986	1996–1998	27	8751
8. Доноры крови		1995–1998	29	7596

*Частота aberrаций хромосом
в лимфоцитах ликвидаторов*

Группа обследованных лиц	Количество лиц с aberrациями, %	Количество клеток с aberrациями, %	Количество лиц с дицентриками и кольцевыми хромосомами, %	Количество дицентриков и колец среди общего количества aberrаций, %	Количество лиц с мультиабберрантными клетками, %	Количество мультиабберрантных клеток, %
1	43,9	1,29	42,1	0,86	1,75	0,019
2	19,7	0,38	13,6	0,82	0	0
3	27,1	0,36	27,1	0,83	0	0
4	30,8	0,54	28,2	0,80	0	0
5	16,7	0,14	16,7	1,00	0	0
6	33,3	0,33	6,7	0,15	0	0
7	88,8	1,68	14,8	0,04	3,70	0,014
8	86,2	1,42	20,7	0,05	3,45	0,013

*Частота aberrаций различного типа
в лимфоцитах обследованных лиц*

Группа обследованных лиц	Количество aberrаций на 100 клеток					
	всего	хромосомного типа	хроматидного типа	дицентриков и колец	парных фрагментов	пробелов
1	1,34	1,24	0,094	1,000	0,320	0
2	0,43	0,37	0,060	0,350	0,031	0,031
3	0,36	0,34	0,015	0,298	0,045	0,140
4	0,54	0,54	0	0,430	0,080	0,054
5	0,14	0,14	0	0,140	0	0
6	0,36	0,22	0,140	0,056	0,170	0,170
7	1,99	1,18	0,810	0,069	1,030	0,389
8	1,51	1,17	0,340	0,079	0,960	0,066

Известно, что влияние генотоксических факторов окружающей среды может проявляться в возникновении хромосомных aberrаций в лимфоцитах крови задолго до развития выраженной патологии органов и систем. Проведенный непосредственный цитогенетический анализ лимфоцитов лиц, принимавших участие в ликвидации последствий аварии на ЧАЭС, указывает на увеличение у них числа aberrантных клеток, в которых количество и тип aberrаций варьируются зависимости от длительности работы и от сроков исследования после аварии (табл.2, 3, 4). При этом обращает на себя внимание зависящее от времени снижение у ликвидаторов числа радиационнозависимых нестабильных aberrаций и увеличение количества aberrаций, указывающих на снижение резистентности клеток к последующему действию других факторов окружающей среды. Следует отметить нарастание в течение последних 10–12 лет числа aberrантных лимфоцитов у так называемых здоровых лиц, в качестве которых рассматривались доноры крови. У последних наблюдается нерезко выраженный рост числа нестабильных aberrаций хромосомного и хроматидного типа с некоторым увеличением частоты дицентриков и даже с появлением единичных мультиaberrантных клеток. Обнаружение большего числа aberrаций в лимфоцитах ликвидаторов по сравнению с донорами крови может быть обусловлено несколько большей скоростью их накопления у первых под влиянием факторов окружающей среды (индуцированная генетическая нестабильность), хотя индивидуальная вариабельность при этом оказывается высокой.

3. ГЕНЕРАЦИЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В ЛИМФОЦИТАХ

3.1. Принцип метода

Активация лимфоцитов, которая имеет место на начальных этапах действия различных факторов экзогенной и эндогенной природы, связана с поглощением молекулярного кислорода, что сопровождается образованием мощных биооксидантов — активных форм кислорода (АФК). В свою очередь, АФК запускают цепь окислительно-восстановительных реакций конечным итогом которых, с определенной вероятностью, будет передача энергии электронам соответствующих атомов или молекулярных структур. Последующий переход таких электронов из «возбужденного» состояния в «невозбужденное» сопровождается испусканием кванта световой энергии.

Суммарная интенсивность свечения клеточной суспензии или тканей называется собственной хемилюминесценцией. Собственная хемилюминесценция суспензий лимфоцитов попадает в диапазон сверхслабого свечения ($10-10^{+3}$ квантов/с). Для непосредственного измерения такого сверхслабого свечения используются активаторы хемилюминесценции, в частности люминол.

При наличии в клеточной суспензии достаточного количества люминола последний перехватывает практически весь объем АФК, возникающих на первом этапе окислительно-восстановительных реакций. Люминол реагирует с HO , H_2O_2 и O^{-2} (синглетный кислород), и эта реакция сопровождается окислением люминола. Переход люминола в окисленную форму сопровождается испусканием кванта света с длиной волны 430 нм. В результате перехвата АФК люминолом энергия химических реакций с минимальными потерями преобразуется в световую энергию с узким спектральным диапазоном. Поток такой световой энергии на несколько порядков превосходит энергию собственного свечения клеточной суспензии. Это свечение называется люминолзависимой хемилюминесценцией (ЛЗХЛ), и его можно сравнительно просто измерять с использованием имеющегося оборудования, производимого в России (КШДА1, Санкт-Петербург; ИФХМВ-1, фирма «Эверест», Москва; ХЛМЦ-01, Москва, ХЛМ-ССС, Москва) и в других странах (например, LKB-1251, Швеция).

Для стимуляции лимфоцитов *in vitro* используются два способа: адгезия на стекло и стимуляция лектинами, что может рассматриваться как моделирование отдельных процессов, которые имеют место при выполнении лимфоцитами их специфических функций.

При адгезии на стекло происходит стимуляция лимфоцитов за счет неспецифического рецепторного взаимодействия клеток со стеклом и последующего распластывания клеток на поверхности стекла на дне кюветы, сопровождающегося адгезией. Динамика данного процесса определяется толщиной слоя среды, в которую в начале измерения помещаются клетки, скоростью оседания клеток, быстротой реагирования клеток на контакт со стеклом. Перемешивание не используется.

Лектины, которые представляют собой группу белков неиммунного происхождения, обратимо и избирательно связывают углеводы и углеводные детерминанты биополимеров без изменения их ковалентной структуры. Конкретный лектин (фитогемагглютинин, конканавалин А и др.) неспецифически взаимодействует с различными рецепторными структурами на поверхности лимфоидных клеток. Состав этого набора рецепторов определяется соответствием углеводной специфичности данного лектина и составом углеводных цепей соответствующих рецепторов на внешней поверхности клеточной мембраны. Каждый задействованный рецептор запускает определенный внутриклеточный процесс. Сумма этих процессов определяет в конечном итоге степень стимуляции клетки и соответственно количество генерируемых клеткой АФК.

Следует отметить сложность и неоднозначность связи между степенью стимуляции клеток и количеством генерируемых клеткой АФК. Различные внутриклеточные процессы, возникающие в ответ на рецепторное воздействие, сопровождаются разной интенсивностью генерации АФК. Это наглядно демонстрирует сравнительный анализ степени стимуляции образца клеток лектинами различной углеводной специфичности. Но в целом рецепторное взаимодействие клеток с лектинами можно рассматривать как модель реакции клетки на эндогенные и экзогенные регулирующие факторы *in vivo*.

Стимуляция клеток лектинами не исключает стимуляции при адгезии клеток на стекло, и в условиях без перемешивания эти два способа стимуляции действуют одновременно. Динамика процесса хемилюминесценции без перемешивания определяется толщиной слоя среды, в которую в начале измерения помещаются клетки, скоростью оседания клеток, углеводной специфичностью лектина, быстрой реакцией клеток на взаимодействие с лектином и более медленной реакцией клеток на адгезию на стекло.

При наличии перемешивания наблюдается только лектининдуцированная хемилюминесценция лимфоцитов, а также дополнительные эффекты, такие как увеличение скорости протекания реакции и дополнительная стимуляция клеток за счет непосредственного межклеточного контакта, сопровождающего агрегацию клеток под действием лектина. Степень и динамику такой агрегации можно проанализировать с использованием методов оценки светорассеяния (светопропускания). Динамика и степень агрегации клеток зависит от концентрации и углеводной специфичности лектина.

Динамика процесса хемилюминесценции с перемешиванием определяется толщиной слоя среды, в которую в начале измерения помещаются клетки, скоростью оседания клеток, углеводной специфичностью лектина, скоростью реакции клеток на взаимодействие с лектином (скорость реакции зависит от состояния клеток и состава клеточных субпопуляций в суспензии) и интенсивностью перемешивания клеточной суспензии.

3.2. Методика измерения люминолзависимой хемилюминесценции

Концентрация исходной суспензии клеток: 10 млн/мл в 0,15 моль NaCl. Исходная концентрация раствора люминола: $2,5 \times 10^{-4}$ моль в 0,15 моль NaCl. Исходная концентрация CaCl₂: 80 ммоль в 0,15 моль NaCl. Исходная концентрация лектина в случае его использования: 1 мг/мл. Среду Эрла готовят следующим образом: вначале приготавливают кислую компоненту среды (0,12 моль NaCl, 5,37 ммоль KCl, 0,90 ммоль NaH₂PO₄ × 2H₂O, 5,56 ммоль C₆H₁₂O₃, 0,81 ммоль MgSO₄ × 7H₂O), потом в отдельную посуду сливают 1/5 кислой компоненты, в эту же посуду добавляют необходимое количество щелочной компоненты (26,19 ммоль NaHCO₃). Нестерилизованные исходные растворы могут храниться в холодильнике примерно две недели. pH рабочей среды устанавливают в день измерения смешиванием двух компонент. В процессе работы следует контролировать значение pH. Готовая среда Эрла не хранится.

В чашку соответствующего прибора, содержащую 1,9 мл среды Эрла, вносят 0,1 мл клеток исходной суспензии (конечная концентрация клеток — 0,5 млн/мл). К суспензии добавляют 50 мкл раствора люминола (конечная концентрация — $1,25 \times 10^{-5}$ моль), 50 мкл раствора CaCl_2 (конечная концентрация — 2 ммоль) и при необходимости — 50 мкл раствора лектина (конечная концентрация — 25 мкг/мл). После добавления всех компонентов суспензию тщательно перемешивают и чашку устанавливают в рабочую камеру прибора. Измерение выполняют в течение 20–30 мин.

Полученный результат в виде зависимости интенсивности хемилюминесценции от времени сравнивают с интенсивностью собственного шума фотоэлектрической установки. По разнице величин интенсивности рассчитывают (например, автоматически с использованием ЭВМ) значение интенсивности хемилюминесценции в определенный момент времени и интегральную интенсивность ЛЗХЛ за определенный интервал времени.

3. 3. Анализ результатов

Исследования способности лимфоцитов здоровых лиц генерировать АФК при адгезии на стекло (см. [рис.1](#)) и взаимодействии с лектинами, в частности с ФГА и агглютинином из зародышей пшеницы (АЗП), показывают, что она чрезвычайно вариативна, составляет в среднем при адгезии на стекло $26,1 \pm 16,4$, при взаимодействии с упомянутыми лектинами соответственно $278,2 \pm 117,6$ и $159,9 \pm 47,5$ импульсов/ 10^6 клеток/15 мин (указано квадратичное отклонение).

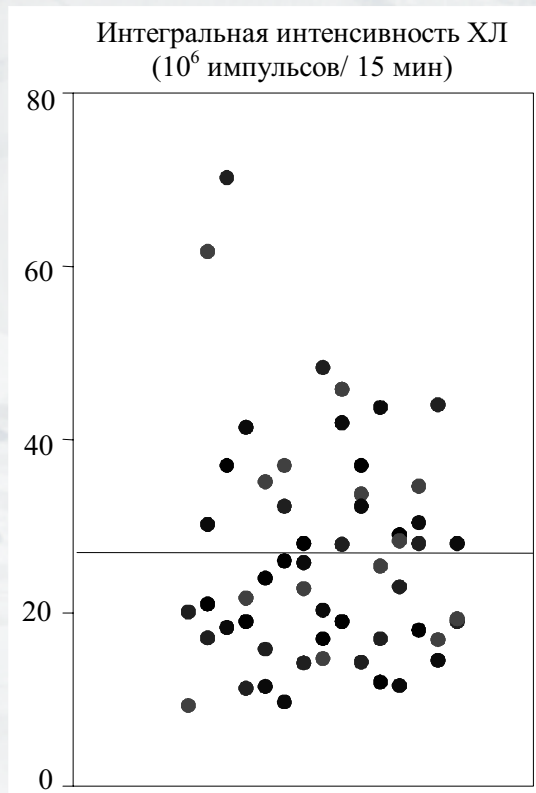


Рис.1. Хемилюминесценция лимфоцитов доноров крови при адгезии на стекло.

Установлена корреляция в образовании АФК при адгезии на стекло и при взаимодействии клеток с лектинами. Вместе с тем диапазон наблюдаемых изменений более выражен при адгезии на стекло. Антигенная стимуляция организма (доноры крови после введения стафилококкового анатоксина с целью получения гипериммунной плазмы) сопровождается увеличением способности лимфоцитов генерировать АФК как при адгезии на стекло (в 1,4 раза), так и при взаимодействии с лектинами (в 1,6–2,4 раза).

В присутствии нестероидных противовоспалительных препаратов (аспирин, анальгин, парацетамол) *in vitro* наблюдали уменьшение интенсивности лектининдуцированной ЛЗХЛ (см. рис. 2, 3, табл. 5).

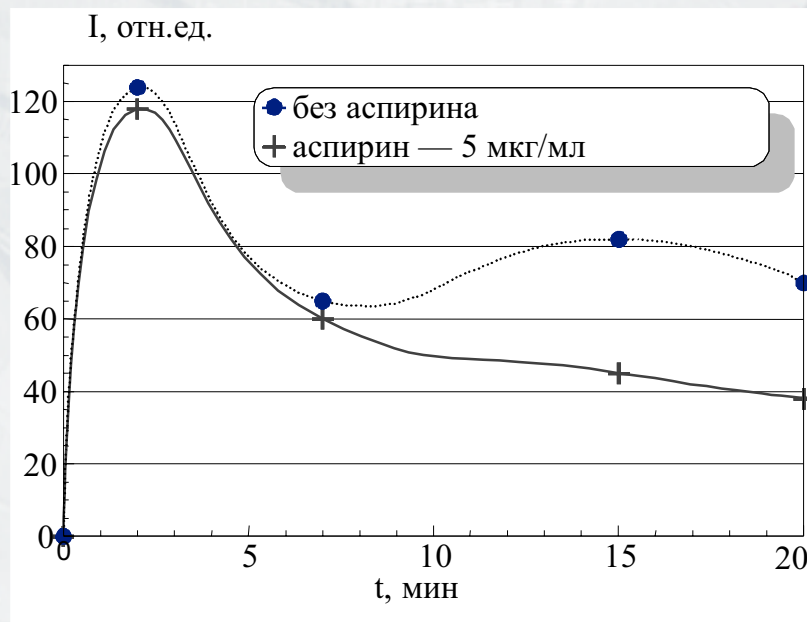


Рис. 2. Вид зависимости интенсивности гемилюминесценции лимфоцитов крови от времени в присутствии/отсутствии аспирина

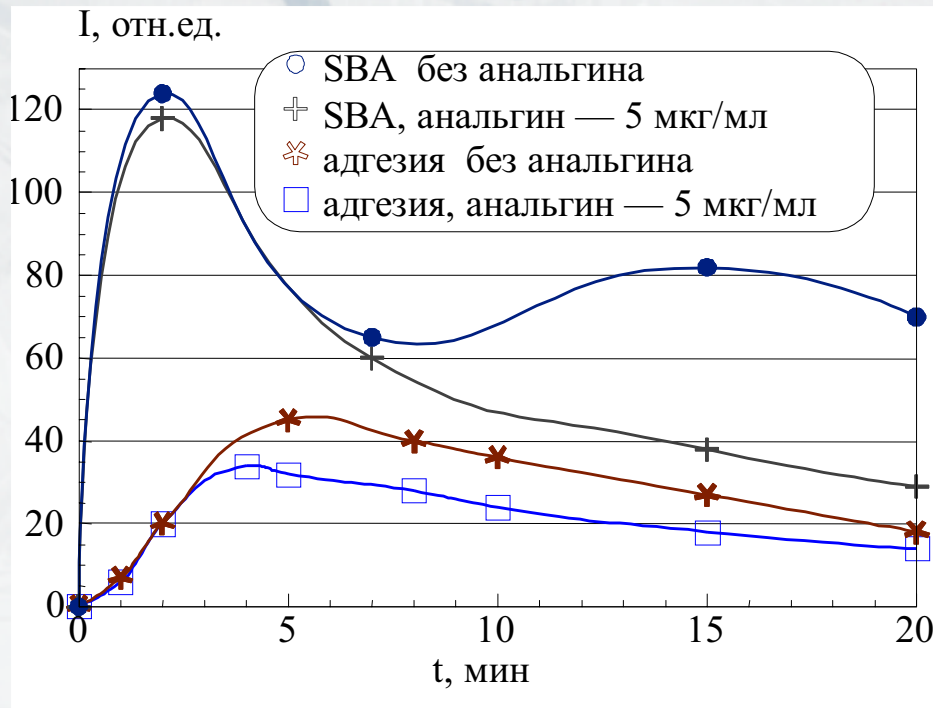


Рис.3. Вид зависимости интенсивности хемилюминесценции лимфоцитов крови от времени в присутствии/отсутствии анальгина

Стероидный гормон дексаметазон, напротив, вызывал дозозависимое до определенной концентрации увеличение генерации АФК лимфоцитами, индуцированной взаимодействием с лектинами и при адгезии клеток на стекло, с последующим ее снижением. При инкубации клеточной суспензии с гормоном в течение первых 5–10 мин последующая способность клеток генерировать АФК значительно возрастает, что, вероятно, обусловлено развитием процесса связывания молекул дексаметазона с клеточной поверхностью. При большем времени инкубации эффект дальнейшего увеличения выражен в значительно меньшей степени. При увеличении концентрации гормона наблюдается возрастание интенсивности ЛЗХЛ при адгезии клеток на стекло, которое достигает максимума в 48% при концентрации гормона 5×10^{-7} моль, а затем до концентрации 3×10^{-6} моль наблюдается уменьшение интенсивности до 18%.

*Интенсивность ЛЗХЛ лимфоцитов
при действии лекарственных препаратов*

Условия стимуляции лимфоцитов	Уменьшение интенсивности ЛЗХЛ в присутствии препаратов в концентрации 5 мкг/мл, %		
	аспирин	аналгин	парацетамол
Адгезия на стекло		28	16
Агглютинин из соевых бобов	28	34	13
Агглютинин из зародышей пшеницы		12	
Фитогемагглютинин		26	

Интенсивность лектининдуцированной ЛЗХЛ при увеличении концентрации дексаметазона возрастает, достигая максимума 26% при концентрации $(5-7) \times 10^{-7}$ моль, затем эффект уменьшается и при концентрации 5×10^{-6} моль, не наблюдается. При больших концентрациях дексаметазона способность лимфоцитов генерировать АФК после инкубации с препаратом меньше, чем в контроле.

Рентгеновское облучение в дозе 0,5–1,0 Гр вызывает увеличение скорости агрегации лимфоцитов под действием лектинов конканавалина А (Кон-А) и ФГА-Р (в концентрациях 25 мкг/мл). Для разных доноров данный эффект выражен в различной степени и через 1,5 ч после облучения составляет 112–142% (для Кон-А) и 108–133% (для ФГА-Р) от скорости агрегации клеток в необлученной суспензии. При постепенном уменьшении интенсивности эффект регистрируется в течение приблизительно 3–4 ч с момента облучения клеток.

Рентгеновское облучение клеток *in vitro* в дозах 0,1–1,0 Гр стимулирует ЛЗХЛ лимфоцитов при адгезии клеток на стекло и при действии лектинов, а в дозах 5–10 Гр — угнетало ее (см. **рис. 4, 5, табл. 6**). Эффект стимулирующего действия рентгеновского облучения на хемилюминесценцию лимфоцитов сохраняется в течение всего времени исследования клеточной суспензии (7–8 ч) (**рис. 6**). В присутствии аспирина генерация АФК облученными лимфоцитами снижается (см. **табл. 7**), в то время как в присутствии дексаметазона она возрастает, что хорошо заметно при дозах облучения до 1 Гр (см. **табл. 8**), что свидетельствует о возможности учета эффектов комбинированного радиационно-химического воздействия на лимфоциты.

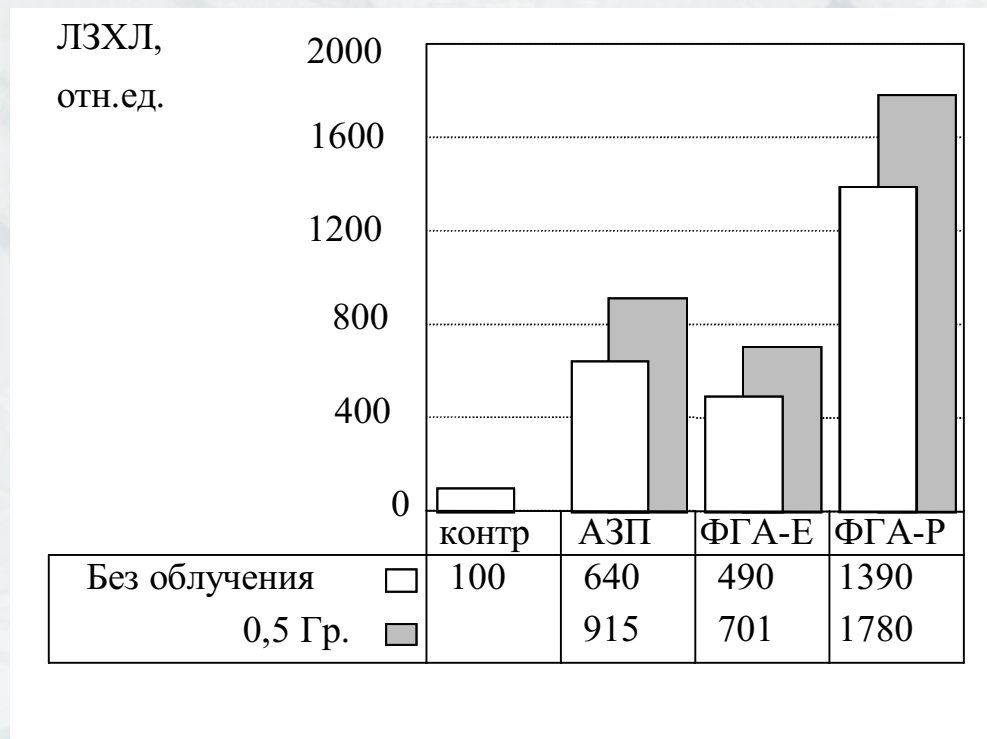


Рис. 4. Интегральная интенсивность ЛЗХЛ лимфоцитов в присутствии лектинов (интегральная интенсивность ЛЗХЛ необлученной клеточной суспензии без лектина принята за 100). Неокрашенные столбики — необлученная клеточная суспензия, окрашенные столбики — лимфоциты после действия рентгеновского облучения в дозе 0,5 Гр.

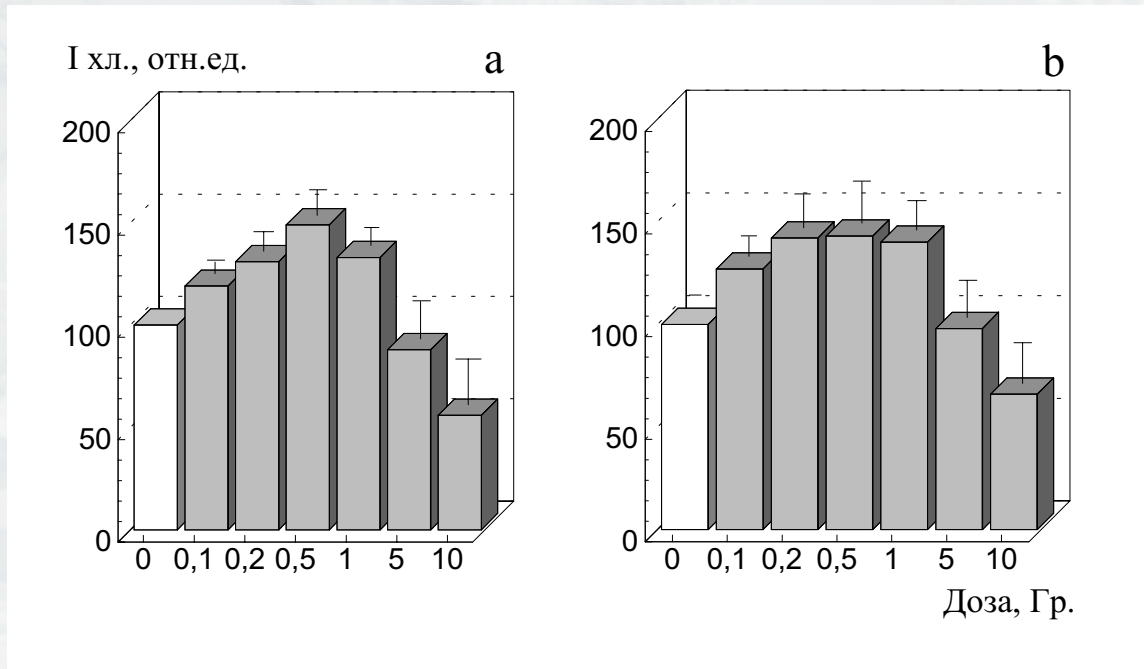


Рис.5. Зависимость интегральной интенсивности ЛЗХЛ при адгезии на стек-ло (а) и при действии лектина АЗП (б) от дозы рентгеновского облучения.
Контроль (необлученная клеточная суспензия) — неокрашенный столбик

*Суммарная хемилюминесценция лимфоцитов
в зависимости от дозы облучения*

Условия стимуляции лимфоцитов	ЛЗХЛ лимфоцитов в% от контроля при дозе облучения, Гр						
	0	0,1	0,2	0,5	1	5	10
Адгезия на стекло	100	119	131	149	133	88	56
Лектин АЗП	100	127	142	143	140	98	66

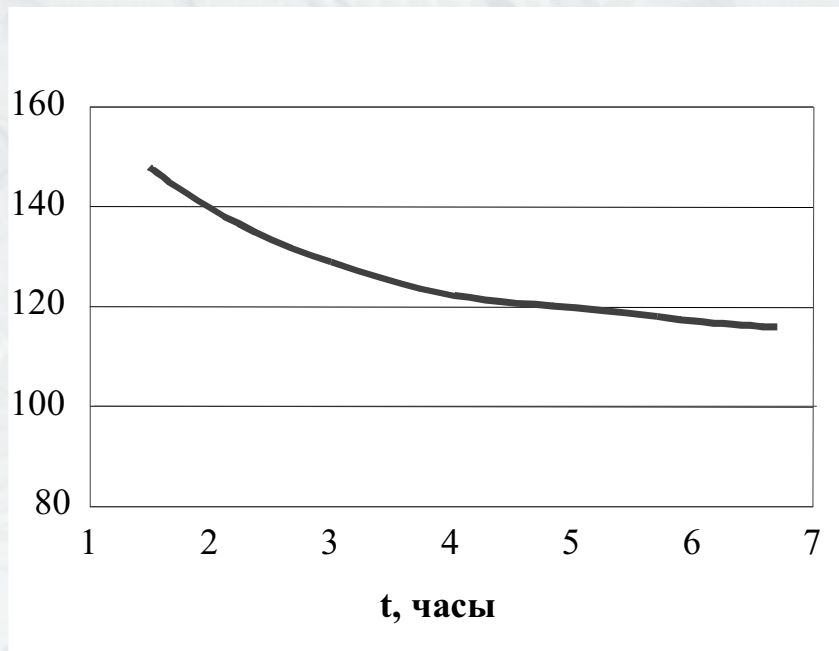


Рис.6. Зависимость интегральной интенсивности хемилюминесценции облученных лимфоцитов (рентгеновское облучение в дозе 0,5 Гр) при адгезии на стекло от времени с момента облучения (t)

Выраженность снижения ЛЗХЛ облученных лимфоцитов в присутствии аспирина (5мкг/мл)

Условия стимуляции лимфоцитов	ЛЗХЛ лимфоцитов в присутствии аспирина, % от контроля, при дозе облучения 0,5 Гр
Адгезия на стекло	13
Фитогемагглютинин	19
Агглютинин из соевых бобов	12

Увеличение интенсивности ЛЗХЛ облученных лимфоцитов в присутствии дексаметазона

Условия стимуляции лимфоцитов	ЛЗХЛ лимфоцитов в присутствии дексаметазона, % от контроля, при дозе облучения до 1 Гр		
	0,2	0,5	1,0
Адгезия на стекло	20	42	24
Фитогемагглютинин	12	28	16
Агглютинин из соевых бобов	17	32	19

4. ОЦЕНКА АПОПТОТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В ЛИМФОЦИТАХ

4.1. Принцип метода оценки апоптоза по фрагментации ДНК

Апоптоз (запрограммированная клеточная гибель) — это непатологический процесс, приводящий через ряд последовательных событий на генетическом и эпигенетическом уровне к смерти клетки. В каждой клетке существуют сигнальные и эффекторные системы программы апоптоза, активируемые внешними или внутренними стимулами. Апоптоз является одним из фундаментальных механизмов поддержания гомеостаза на тканевом и системном уровнях. Сбои в реализации программы апоптоза в клетках лежат в основе в патогенеза и прогрессии ряда заболеваний, включая злокачественные новообразования.

Апоптотическая гибель клетки сопровождается различной степени специфичности изменениями на молекулярном, органелльном и клеточном уровнях. Активация Ca^{2+}/Mg^{2+} -зависимых эндонуклеаз (мишень — преимущественно интернуклеосомная ДНК) является одной из специфических черт апоптотического процесса. В результате высвобождаются фрагменты ДНК, кратные размеру ДНК, входящие в состав нуклеосомы (около 150 пар оснований). Количественная и качественная регистрация данного события возможна с помощью следующих методик.

4.1.1. Электрофорез низкомолекулярной ДНК в агарозном геле (апоптотическая лесенка)

Условия выделения ДНК подобраны таким образом, чтобы максимально преципитировать низкомолекулярную ДНК. Используют одноразовые пластмассовые пробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5–2 мл. Клетки (2–3 млн) осаждают центрифугированием. Затем отмывают от среды в 0,15 моль забуференном физрастворе (ЗФР) (0,15 моль NaCl в 0,1 моль фосфатном буфере pH 7,5) (10 мин при 300–400 g). Щадящий режим центрифугирования объясняется тем, что клетки на терминальных стадиях апоптоза могут разрушаться при центрифугировании, а субклеточные структуры осаждаются с меньшей эффективностью. Увеличение же интенсивности центрифугирования приводит к образованию плотного осадка, который затруднительно растворить в буфере для лизиса. Полученный клеточный осадок суспендируют в небольшом объеме ЗФР. Наличие видимых невооруженным глазом клеточных агрегатов недопустимо. Входящий в состав буфера для лизиса додецилсульфат натрия образует с такими агрегатами стабильный макрокомплекс. Вследствие этого часть биологического материала может быть утеряна. К полученной суспензии добавляют 500 мкл буфера для лизиса. В его состав входят следующие компоненты (концентрация приведена для готового буфера): додецилсульфат натрия 1% (Serva, Германия), ЭДТА 75 ммоль, хлорид натрия 25 ммоль, Трис-HCl 10 ммоль, pH 8,0. Смесь активно перемешивают до образования гомогенного прозрачного раствора. Затем добавляют протеиназу К (Boehringer Mannheim, Германия) до 200 мкг/мл. Лизат оставляют на ночь при 37° С. ДНК экстрагируют равной по объему раствору ДНК смесью фенол-хлороформа 1:1 (15–20 мин при постоянном вращении). Для разделения водной и органической фаз проводят центрифугирование (2500–3000 g, 15 мин). Водную фазу аккуратно отбирают (стараясь не захватить интерфазный слой, содержащий денатурированные протеины) и переносят в чистую центрифужную пробирку. В нее добавляют

равное по объему водной фазе количество хлороформа. Повторяют операции, которые сопровождают процесс экстракции смесью фенол-хлороформ. Полученная водная фаза содержит растворенную ДНК.

ДНК осаждают добавлением 3 мл абсолютного этанола и 265 мкл 4 моль ацетата натрия (концентрации в пробе: этанол 77%, ацетат натрия 0,3 моль). Процесс осаждения ДНК проводят в течение ночи при -20°C . Осадок ДНК получают путем центрифугирования при 4000–5000 g в течение 30 мин при 4°C . Осадок промывают холодным (из морозильника) 70% этанолом. Центрифугирование. Осадок ДНК высушивают под вакуумом и растворяют в небольшом объеме буфера для электрофореза (для приведенного количества клеток это может быть 50 мкл Трис 10 ммоль, ЭДТА 1 ммоль, pH 8,0). Процесс растворения ДНК длителен. Его можно ускорить (1–2 ч) прогреванием при 50°C на водяной бане.

Количество ДНК в пробе определяют по оптической плотности при 260 нм (1 единица оптической плотности соответствует 50 мкг ДНК/мл). Степень очистки ДНК контролируют по соотношению оптической плотности при 260/280 нм. Это соотношение должно находиться в диапазоне 1,6–1,8. Количество ДНК в пробах в случае необходимости доводят до 10–20 мкг в объеме 15 мкл. К пробам добавляют РНК-азу А до концентрации 50 мкг/мл (инкубация в течение 3 ч при 37° С) (в случае загрязнения ДНК-азами для инактивации последних допускается прогревание раствора РНК-азы А при 80° С в течение 10–15 мин). После этого к образцам добавляют ксилол-цианол до 0,01% и бромфеноловый синий до 0,01% (лидирующий краситель). Электрофорез проводят в 1,2% агарозном геле, содержащем 5 мкг/мл пропидиум иодида, при постоянном напряжении 80 мВ. Результаты фиксируются при прохождении лидирующим красителем расстояния в 6–8 см. Для визуализации необходим стандартный трансиллюминатор, укомплектованный УФ-фильтром. На электрофореграмме виден набор дискретных полос ДНК, так называемая апоптотическая лесенка. Может быть использовано любое доступное оборудование для горизонтального электрофореза в агарозном геле, укомплектованное блоком питания, который может обеспечить вышеописанные условия электрофореза. При работе с трансиллюминатором обязательно использование защитного шлема, предохраняющего лицо от УФ-облучения. Данный метод качественный и не позволяет строго оценить интенсивность апоптотических процессов в исходных клетках. Этот недостаток не свойственен другому методу регистрации интенсивности деградации ДНК при апоптозе.

4.2. Принцип детекции апоптотических клеток по содержанию ДНК

Молекулярной основой метода является отличие в растворимости между высокомолекулярной организованной в нуклеосомы ДНК и низкомолекулярной ДНК, генерируемой $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -зависимыми эндонуклеазами. Низкомолекулярная ДНК растворяется в используемой для экстракции ДНК среде. Оставшееся в клетке количество ДНК оказывается меньше диплоидного. Такие клетки и регистрируются с помощью проточного цитофлуориметра как апоптотические. Ниже подробно приводятся несколько методик, основанных на использовании описанного принципа.

4.2.1. Экстракция ДНК из предварительно фиксированных клеток

Для анализа необходимо около 1,5 млн клеток. Клетки осаждают центрифугированием при 120 g в $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -свободном ЗФР (ионы $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ влияют на степень конденсации хроматина и, следовательно, на растворимость ДНК). Затем дважды отмывают в среде такого же состава. Клетки фиксируют при постоянном перемешивании, добавляя по каплям 70% холодный этанол. В результате такой фиксации пермеабилзируются клеточные мембраны. Внутренние компартаменты клетки становятся доступны для буферов, растворяющих низкомолекулярную ДНК. Фиксированные клетки хранят в течение ночи при 4° С. Перед анализом клетки осаждают центрифугированием (очень осторожно, так как фиксированные клетки очень хрупки) при не более чем 120 g в течение 5–10 мин. Затем клетки отмывают в $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -свободном ЗФР и ресуспендируют в 1 мл раствора для окраски ДНК (50 мкг/мл йодистого пропидия (Aldrich, США) в $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -свободном ЗФР pH 7,4; до 0,5 мг/мл РНК-азы А (Serva, Германия). Инкубация 30 мин при комнатной температуре. Для анализа количества ДНК в клетке используют проточный цитофлуориметр FACScan (Becton Dickinson, США), оборудованный 488 нм аргоновым лазером. Учитывают 10 000 событий в трех повторах. Для регистрации используют 575 нм фильтр (FL3, красная флуоресценция). Данные анализируют с помощью программы Lysis II software (Becton Dickinson, США). Апоптотическими считают клетки с содержанием ДНК в диапазоне от диплоидного до 10% от диплоидного. Клеточные обломки отсекают с помощью установки порога прямого светорассеяния. Результат учитывают на линейной шкале каналов интенсивности флуоресценции.

Степень деградации ДНК при апоптозе зависит от стадии данного процесса, типа клеток и природы индуцирующего апоптоз агента. Экстрагируемость ДНК при процедуре окрашивания также варьирует. Для стандартизации процедуры экстракции ДНК для растворения низкомолекулярной ДНК используют высокомолярный цитрат-фосфатный буфер (0,2 моль, рН 7,8).

4.2.2. Пермеабиллизация клеток неионным детергентом

Данная процедура не требует предварительной фиксации клеток этанолом. Для анализа требуется около 1,5 млн клеток. Клетки после отмывания в ЗФР ресуспендируют в 1,5 мл раствора флуорохрома (50 мкг/мл йодистого пропидия, 0,1% цитрата натрия, 0,1% Тритона X-100 (все реагенты — Sigma, США)). Клетки инкубируют в этом растворе в темноте при 4° С до проведения анализа с использованием логарифмической шкалы. Ядра, содержащие гиподиплоидное количество ДНК, учитывают как апоптотические (% от общего количества учитываемых событий).

4.2.3. Замечания по поводу оценки апоптотических клеток с помощью определения количества ДНК в клетке

Эта методика является одной из самых дешевых и технологичных. Она незаменима в случае скрининга большого количества образцов, например, при определении чувствительности клеток к большому количеству факторов и их комбинаций. Недостатком этого метода является то, что он основан на неспецифическом признаке апоптоза. В ряде случаев апоптотические процессы в клетках не сопровождаются генерацией низкомолекулярных фрагментов ДНК. В этом случае апоптотические клетки не могут быть выявлены по гиподиплоидному содержанию ДНК. Существует еще ряд ограничений в использовании этого метода. Например, если апоптоз индуцируется в клетке, содержащей большее по сравнению с диплоидным количество ДНК (клетка в S-фазе митоза), то частичная потеря ДНК может привести к сдвигу такой клетки в область G₀/G₁.

Существующие методики пермеабализации клеточной мембраны не являются щадящими. Имеется вероятность образования множества клеточных фрагментов (например, отдельные хромосомы из митотических клеток, хромосомные агрегаты, фрагменты ядра), которые, как и контаминирующие культуру бактерии, могут быть ошибочно приняты за апоптотические клетки. В результате возможна гипероценка интенсивности апоптотических процессов. Можно рекомендовать сочетать приведенные в данном разделе методики с другими более специфичными методиками учета апоптотических клеток, например морфологических. Это позволяет с большей уверенностью относиться к полученным результатам.

4.3. Выявление разрывов в ДНК апоптотических клеток *in situ*

Эта методика осуществляется с помощью метки нуклеотидами, конъюгированными с флуорохромом, биотином или дигоксигенином, при участии ферментов терминальной дезоксирибонуклеотидил трансферазы (метод TUNEL) или ДНК-полимеразы (ник-трансляция). Ее относительно меньшая доступность компенсируется наличием соответствующих коммерческих наборов.

4.4.Регистрация конденсации и фрагментации хроматина апоптотических клеток с помощью флуоресцентной микроскопии

Протеолитический каскад апоптотических протеаз является эффекторным звеном реализации процесса запрограммированной клеточной гибели. Считается, что после активации каспазного каскада процесс гибели клеток становится неизбежным и необратимым. Субстратом для каспаз являются ядерные протеины, чья функция заключается в репарации и репликации ДНК, сплайсинге РНК (полиаденозиндифосфатрибозил полимеразы, ДНК-зависимая протеинкиназа, топоизомераза I), а также компоненты цитоплазмы и цитоскелета (ламинин, фодрин и т.д.). Морфологические изменения, характерные для апоптотических клеток, обусловлены именно этим процессом.

4.4.1. Принцип метода

Одним из таких морфологических признаков апоптоза является изменение ядерной морфологии, проявляющееся в конденсации и фрагментации ядерного хроматина. С определенной долей обобщения этот процесс можно описать как следующую последовательность событий. На первых этапах происходит образование конденсированных участков хроматина в перинуклеарной области (в виде серпа или лошадиной подковы). По мере развития этого процесса возможно появление областей конденсированного хроматина в центральной области ядра. Участков конденсации может быть несколько. Затем происходит образование так называемых «апоптотических тел» (изолированные ядерные фрагменты вместе с содержимым цитоплазмы, включающие интактные органеллы и окруженные фрагментами плазматической мембраны). При некротической гибели клеток в некоторых случаях тоже происходит конденсация хроматина. Но в этом случае глыбки конденсирующегося хроматина имеют неправильные края, трудно идентифицируются и никогда не формируют ограниченные мембраной фрагменты; цитоплазма и ее органеллы прогрессивно разрушаются; повреждаются большие массивы клеток. Анализ описанных выше специфических морфологических признаков апоптоза с помощью флуоресцентной микроскопии является наиболее простым и надежным методом количественного учета клеток, элиминирующихся по пути запрограммированной клеточной гибели.

4.4.2. Методика определения апоптотических клеток по их морфологическим признакам

В качестве базовой рекомендуется следующая методика, используемая с некоторыми изменениями. К одному объему клеточной суспензии добавляют один объем 2% параформальдегида (Serva, Германия) в ЗФР. Клетки предварительно не отмывают, чтобы избежать разрушения апоптотических клеток. Фиксацию проводят при 4° С в течение 30 мин. После центрифугирования клеточный осадок ресуспендируют в 1% растворе параформальдегида в ЗФР. К клеточной взвеси добавляют Тритон X-100 (Serva, Германия) до 0,1% и акридиновый оранжевый (Aldrich, США) до конечной концентрации 10 мкг/мл. Время окрашивания составляет 30 мин при 4° С. После отмывки морфологию ядер клеток анализируют на флуоресцентном микроскопе ЛЮМАМ Р2 (ЛОМО, Россия) при увеличении ×900. Учитывается 500 клеток. Клетки с конденсированным и фрагментированным хроматином считают как апоптотическими. Результаты, полученные с помощью этой методики, хорошо коррелируют с другими методами учета апоптотических клеток (содержание ДНК, тест с аннексином V, МТТ-тест), по крайней мере при культивировании клеток в течение 3 сут (см. [рис. 7](#)). Существенным недостатком этого метода является большая трата времени при выполнении анализов. В любом случае, флуоресцентная микроскопия необходима для верификации других методик учета апоптотических клеток.

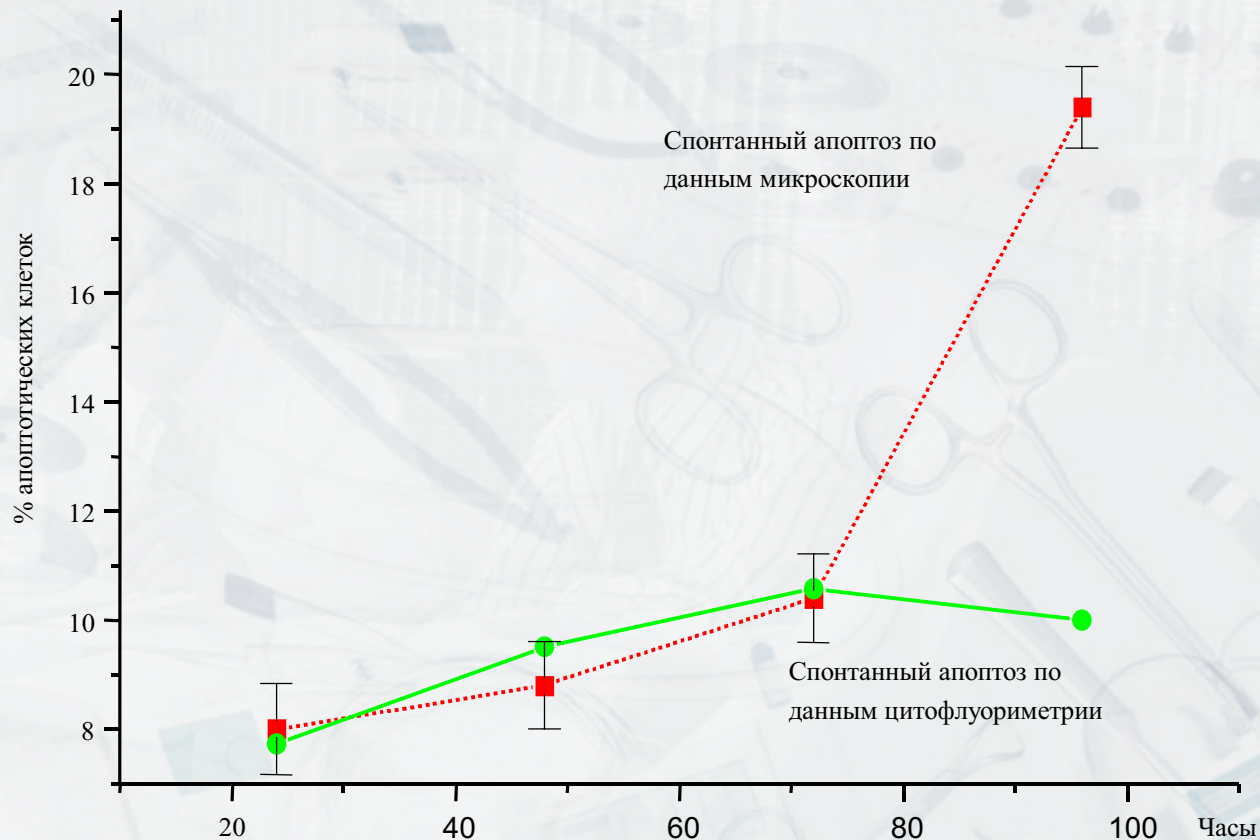


Рис. 7. Сравнительная оценка интенсивности спонтанного апоптоза в зависимости от длительности культивирования клеток с помощью морфологического метода и метода проточной цитометрии

4.5. Учет апоптотических клеток по другим специфическим признакам

Кроме методов, сфокусированных на выявлении апоптотических событий, связанных с клеточным ядром и хроматином и обусловленных активацией ряда протеолитических ферментов (каспаз) в эффекторной фазе выполнения апоптотической программы, существует ряд методов, учитывающих достаточно специфические признаки апоптоза, которые проявляются на более ранних этапах апоптотической программы.

4.5.1. Оценка изменений трансмембранного потенциала митохондрий

Можно анализировать уменьшение митохондриального трансмембранного потенциала, что отражает разобщение процесса окислительного фосфорилирования в митохондриях (транспорт зарядов по дыхательной цепочке не сопряжен с синтезом АТФ) и может быть определено с помощью таких флуорохромов, как родамин 123; 5,5',6,6'-тетрахлор-1,1',3,3'-тетраэтилбензимиодазолкарбоцианин (JC-1); и 3,3'-дигексилоксикарбоцианин иодид [DiOC₆(3)]. Эти красители благодаря их катионной липофильной структуре проникают в митохондрии. При падении $\Delta\Psi_m$ их поступление в митохондрии уменьшается. Таким образом, можно разделить клетки с нормальным потенциалом и преапоптотические клетки с низким $\Delta\Psi_m$

4.5.2. Оценка апоптотических клеток по перемещению фосфатидилсерина на внешнюю поверхность клеточных мембран

Экспозиция на внешней поверхности клеточной мембраны аминокислоты фосфолипидов фосфатидилсерина, который, действуя через специфический рецептор, ускоряет процесс захвата клетки фагоцитами, также является одним из ранних признаков апоптоза, который можно выявить с помощью аннексина V. При использовании проточного цитофлуориметра удается разделить клеточную популяцию на три отдельных группы: живые клетки, апоптотические клетки, мертвые клетки (некротические или на поздних стадиях апоптоза)

4.5.3. Изменения в проницаемости цитоплазматической мембраны

Одним из свойств цитоплазматической клетки является ее способность препятствовать проникновению во внутренние компартаменты клетки таких катионных красителей, как трипановый синий, пропидиум иодид и этидиум бромид, 7-аминоактиномицин D. Потеря барьерной функции цитоплазматической мембраны свидетельствует о нарушении ее целостности и предполагает наличие фатальных повреждений клетки. В настоящее время широко используются методы оценки клеточной жизнеспособности с помощью вышеназванных красителей. Так например, тест с пропидием иодидом адаптирован для проточной цитофлуориметрии и может быть совмещен с иммунофенотипированием поверхностных клеточных маркеров. По мере развития апоптотических процессов в клетке цитоплазматическая мембрана постепенно теряет свои барьерные функции. Катионные красители беспрепятственно проникают в мертвые клетки, в значительно меньшей степени накапливаются в апоптотических клетках и в минимальной степени прокрашивают интактные клетки. Применительно к проточной цитофлуориметрии, благодаря отличию свойств мембран интактных, апоптотических и мертвых клеток удастся разделить их на три группы по накоплению красителя и, как следствие, по интенсивности флуоресценции. Такие методики привлекательны тем, что объектом изучения являются предварительно необработанные клетки, что подразумевает сохранение их жизнеспособности. Некоторые методики выполнимы лишь на цитофлуориметрах, оснащенных ультрафиолетовым лазером, что необходимо для возбуждения флуоресценции таких красителей, как, например, Hoechst 33342.

Для регистрации апоптотических клеток используются и другие красители, связывающиеся с ДНК, как, например, SYTO-16 и LDS-751. К сожалению, для эмиссии и в этих случаях необходимо использовать УФ аргоновый лазер.

4.6. Принцип МТТ-теста

Использование метилтиазолтетразолия (МТТ-анализ) для выявления жизнеспособных клеток по их метаболической активности после различных экспериментальных воздействий прекрасно дополняет исследование апоптотических процессов в клетках благодаря тому, что митохондриальные дегидрогеназы живых клеток превращают растворимый 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолиум бромид в нерастворимый формазан, который переводится в растворимую форму с помощью додецилсульфата натрия или некоторых других соединений, придавая раствору пурпурный цвет, интенсивность которого зависит от числа жизнеспособных клеток и оценивается с помощью ELISA-ридера.

4.6.1. Методика выполнения МТТ-теста

В лунки 96-луночных плат вносят по 90 мкл взвеси лимфоцитов (исходная концентрация клеток 1,5 млн/мл), инкубируют их в течение 48 ч при 37° С. Затем добавляют по 20 мкл МТТ в концентрации 5 мкг/мл. Время экспозиции с МТТ составляет 4 ч. После этого клетки ресуспандируют в лизирующем растворе, содержащем 50% 2-пропанола, 10% додецилсульфата натрия, 0,01 N соляную кислоту. Объем лизирующего раствора — 100 мкл на лунку. Результаты учитывают на ELISA-ридере при длине волны 540 нм (рис. 8).

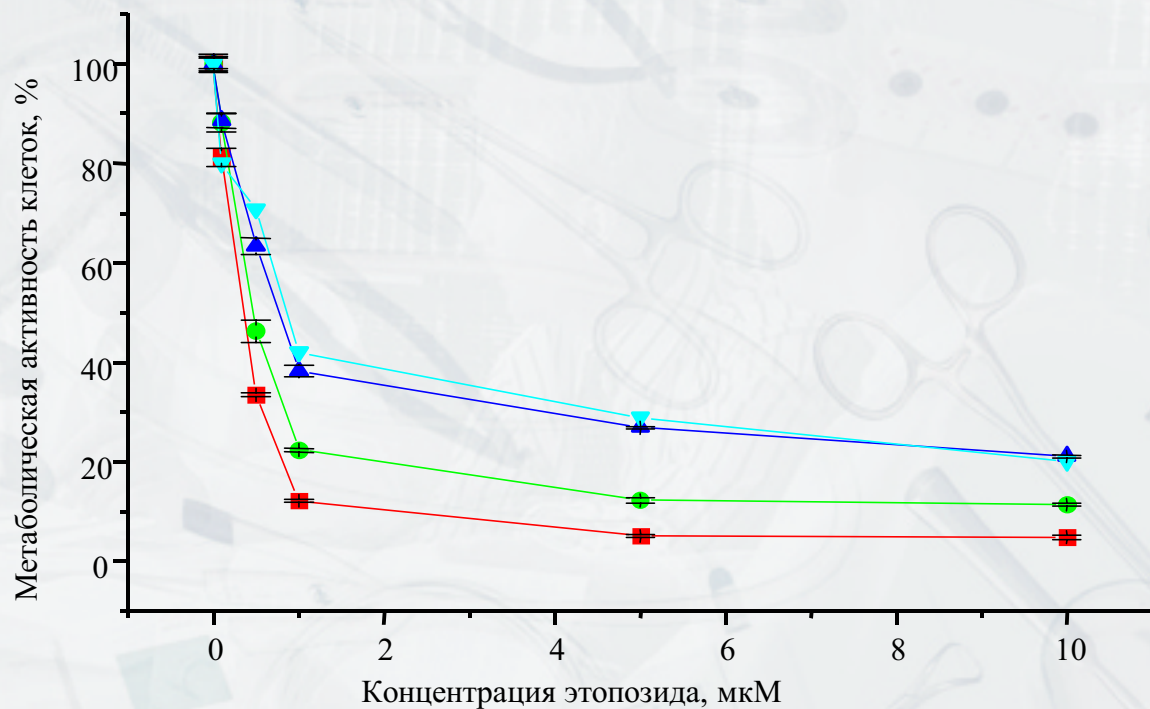


Рис. 8. Метаболическая активность клеток в присутствии цитостатического препарата в различных условиях культивирования

4.7. Анализ результатов

Содержание клеток с конденсированным и фрагментированным хроматином среди лимфоцитов, выделенных из крови здоровых лиц, не превышает 10% после культивирования в течение суток и 20% после культивирования в течение двух суток (см. табл. 9). Апоптотические процессы могут быть индуцированы в лимфоцитах с помощью разнообразных факторов: кортикостероидов, цитостатических препаратов, рентгеновского облучения. Эти эффекты зависят от интенсивности и времени воздействия (см. табл. 9, 10). Так, дексаметазон в концентрации 1 мкмоль способен индуцировать апоптотические процессы в небольшой части нормальных лимфоцитов: количество апоптотических клеток увеличивается при этом в среднем на 5,3% (колебания от 0,8 до 12,9%) по сравнению с контрольными пробами, через 48 ч — на 7,5% (колебания от 3,4 до 17,8%). При повышении концентрации дексаметазона в среде до 5 мкмоль происходит дальнейшее накопление апоптотических клеток. Как и для предыдущей концентрации, через 48 ч в культуре было больше апоптотических клеток, чем через 24 ч.

Влияние химических факторов на апоптоз лимфоцитов

Препарат	Концентрация	Время культивирования клеток, ч	Количество апоптотических клеток, %
—	—	24	4,2 ± 0,6
		48	10,7 ± 0,9
Дексаметазон	1 мкмоль	24	9,5 ± 0,8
		48	18,2 ± 1,8
	5 мкмоль	24	14,3 ± 1,1
		48	23,6 ± 2,4
Флударабин	0,1 мкг/мл	24	4,4 ± 1,0
		48	11,8 ± 1,3
	1 мкг/мл	24	8,7 ± 1,2
		48	22,0 ± 2,9
	10 мкг/мл	24	18,9 ± 3,5
		48	41,5 ± 3,4
	50 мкг/мл	24	25,2 ± 3,6
		48	48,5 ± 4,3
	200 мкг/мл	24	33,7 ± 2,9
		48	54,0 ± 3,8

Влияние рентгеновского облучения на индукцию апоптотических процессов в лимфоцитах

Доза облучения, Гр	Количество апоптотических клеток в культуре лимфоцитов в зависимости от уровня спонтанного апоптоза через 24 ч после облучения	
0	13,0 ± 1,8	9,0 ± 0,7
0,5	21,4 ± 1,3	17,6 ± 0,6
1	34,4 ± 0,9	31,4 ± 1,2
2	43,0 ± 1,2	39,6 ± 0,9
3	45,8 ± 2,5	51,0 ± 1,6
5	53,6 ± 1,2	49,8 ± 0,9

Лимфоциты оказались практически нечувствительными к минимальной концентрации (0,1 мкг/мл) цитостатического препарата флударабина. Однако при повышении концентрации препарата в среде культивирования отмечено дозозависимое накопление апоптотических клеток (более 50% при концентрации препарата 200 мкг/мл после воздействия в течение 48 ч). Вместе с тем выраженность апоптотических процессов варьируется для отдельных образцов лимфоцитов. Обращает на себя внимание тот факт, что лимфоциты иммунизированных доноров характеризуются меньшей устойчивостью к спонтанному апоптозу и к апоптозу, индуцированному химическими факторами в минимальной концентрации.

Возможно использование различных показателей апоптоза для ближайшего и долгосрочного прогноза течения ряда заболеваний, определения чувствительности к терапии, генетически детерминированной чувствительности к действию профессиональных и других потенциально опасных факторов окружающей среды, для изучения патогенеза, в первую очередь, аутоиммунных и онкологических заболеваний, для манипуляции различными факторами, вовлеченными в апоптоз, при создании новых лекарственных средств и методов лечения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Оценка возможностей методов анализа лимфоцитов периферической крови, которые позволили бы использовать эти клетки как индикаторные для обнаружения доклинических изменений в организме, способствует исследованию фундаментальных свойств лимфоцитов с точки зрения последующего диагностического осмысливания их вариабельности.

В плане регистрации сочетанного изменения тех или иных свойств лимфоцитов при воздействии на них разнообразных факторов *in vitro* следует подчеркнуть, например, тот факт, что в лимфоцитах повышенная генерация активных форм кислорода сочетается, с одной стороны, с усилением апоптотических процессов, а с другой — с накоплением хромосомных aberrаций. Нарастание интенсивности воздействия может привести к снижению образования активных форм кислорода, хотя при этом в клетках увеличивается частота цитогенетических нарушений и большое количество клеток вступает на путь апоптоза с последующим процессом их некротической гибели. Вполне возможно, что количественные закономерности этих процессов и лежат в основе интегральных компенсаторно-приспособительных (как вариант — опухолевая трансформация), а затем и альтернативных процессов при действии экзогенных и эндогенных факторов.

Накопление лимфоцитов с морфологически измененными ядрами у лиц, подвергшихся неблагоприятному воздействию факторов окружающей среды, совпадает с увеличением среди лимфоцитов клеток с хромосомными абберациями. Вместе с тем отсутствие повышенного содержания клеток с характерной ядерной морфологией в крови здоровых людей после искусственной антигенной стимуляции организма не исключает приобретения лимфоцитами способности к повышенной генерации активных форм кислорода при дополнительном воздействии на эти клетки и повышенной чувствительности к действию повреждающих факторов, что проявляется в возможности возникновения цитогенетических нарушений и индукции апоптотических процессов.

Таким образом, в результате изучения структурно-функциональных свойств лимфоцитов периферической крови в клинических условиях и закономерностей их ответа на физические и химические факторы *in vitro* показано, что морфологическая гетерогенность лимфоцитов, их цитогенетические особенности и способность к генерации активных форм кислорода, а также готовность к вступлению на путь запрограммированной гибели являются теми фундаментальными клеточными свойствами, анализ которых позволяет рассматривать лимфоциты как тест-клетки для оценки влияния факторов окружающей среды на организм и возможности формирования предпатологических состояний.