

# Молекулярная диагностика: лазерная сканирующая и проточная цитометрия в исследовании апоптоза

В.Н. Залесский

ННЦ «Институт кардиологии имени академика Н.Д. Стражеско» НАМН Украины, Киев

**Резюме.** Обзор посвящен обсуждению диагностического значения методов анализа (лазерная сканирующая и проточная цитометрия) апоптозозависимых состояний. Приведены результаты основных исследований по этому вопросу.

**Ключевые слова:** лазерная сканирующая цитометрия, проточная цитометрия, апоптоз, молекулярная диагностика.

Проточная цитометрия является современной технологией быстрого измерения параметров клетки, ее органелл и происходящих в ней процессов. Методика проточной цитометрии заключается в выявлении рассеяния света лазерного луча при прохождении через него клетки в струе жидкости, причем степень световой дисперсии позволяет получить представление о ее размерах и структуре. Кроме того, в ходе анализа учитывается уровень флуоресценции химических соединений, входящих в клеточный состав (аутофлуоресценция) или внесенных в исследуемый образец перед проведением проточной цитометрии (Shapiro H.M., 2003).

Принцип метода включает мечение флуоресцирующими моноклональными антителами или флуоресцентными красителями клеточной суспензии, которая попадает в поток жидкости, проходящей через проточную ячейку. Условия подобраны таким образом, что клетки выстраиваются друг за другом в результате так называемого гидродинамического фокусирования струи в струе (Macey M.G., 2007).

В момент пересечения клеткой лазерного луча детекторы фиксируют: 1) рассеяние света под малым углом ( $1-10^\circ$ ), что используется для определения размеров клетки; 2) рассеяние света под углом  $10^\circ$  (позволяет судить о соотношении ядро/цитоплазма, а также о неоднородности и гранулярности клеточного содержимого); 3) интенсивность флуоресценции (позволяет определять субпопуляционный состав клеточной суспензии) и др. (Robinson J.P., 2008).

Среди наиболее часто применяемых флуорохромов находятся следующие: флуоресцеин изотиоционат (FITC), фикоэритрин (PE, RD1), перидининхлорофилл протеин (Per-CP), алофикоцианин (APC), а также тандемные красители (фикоэритрины Cy5 и Cy7) (Shapiro H.M., 2003).

Области применения метода включают: иммунофенотипирование клеток периферической крови, исследование иммунного статуса, определение фагоцитарной активности, определение внутриклеточных цитокинов, определение экспрессии поверхностных антигенов, оценка активности

внутриклеточных ферментов с помощью флуорогенных субстратов, количественный анализ внутриклеточных компонентов (ДНК), анализ стадий клеточного цикла, исследование механизмов клеточной гибели (апоптоза) (Darzynkiewicz Z. et al., 2001; Darzynkiewicz Z., Bedner E., 2001; Shapiro H.M., 2003; Lenz D. et al., 2005; Carey J.L., 2007; Harnett M.M., 2007; Holme A.L. et al., 2007; Wijsman J.A. et al., 2007; Peterson R.A. et al., 2008; Szekvolgui L. et al., 2009; Takahashi H. et al., 2009; Yin X.M., Dong Z., 2009).

Известно, что развитие клеточной биологии происходило параллельно совершенствованию аналитической базы количественных исследований и методологии изучения клеток и клеточных органелл. Этапы развития включали оптимизацию методов микроспектрометрии, ауторадиографии, а в последнее время — лазерной сканирующей цитометрии.

Применение лазерной сканирующей цитометрии в области некробиологии клетки включало два основных направления исследования. Во-первых, позволяло проводить количественное определение апоптотирующих клеток. При этом трудности в идентификации этих клеток были связаны с дифференцированием апоптотического и некротического сценария клеточной гибели на линиях эпителиальных клеток и фибробластов (Collins R.J. et al., 1992; Catchpole D.R., Stewart B.M., 1993; Ormerod M.G. et al., 1994; Darzynkiewicz Z. et al., 1997). Возникновение программированной клеточной гибели связано с факторами торможения активности специфических эффекторов или с недостатком характерных белков, медирующих функционирование этих эффекторов. Например, ингибиторов протеаз, супрессирующих деградацию специфических протеинов («субстратов гибели»), а также ядерного белка, ламина, что, тем самым, предупреждает разрушение ядра (Hara S. et al., 1996) или расщепление PARP (poly(adenosine diphosphate-polymerase) — поли(аденозиндифосфат-рибоза) полимеразы). Поэтому каскад изменений клеточной морфологии до настоящего времени служит в качестве золотого стандарта для распознавания апопто-

тической клеточной гибели (Kerr J.F. et al., 1972; Majno G, Joris I., 1995; Березовский В.А. и соавт., 2003; Залесский В.Н. и соавт., 2003). В этой связи применение лазерной сканирующей цитометрии позволило осуществить детальный морфологический анализ с выявлением специфических структурных особенностей исследуемых образцов (Kamentsky L.A. et al., 1997; Darzynkiewicz Z. et al., 1999; Kamentsky L.A. 2001; Bollmann R., Mehes G., 2004; Luther E. et al., 2004; Auld D.S. et al., 2006; Pozarowski P. et al., 2006; Darzynkiewicz Z. et al., 2008; Galbary S., Kullifay P., 2008).

Другой объективной характеристикой метода являются его возможности в раскрытии механизмов, ассоциированных с предрасположенностью клеток к апоптозу через активацию специфических каскадов внутриклеточной сигнализации. Поэтому лазерную сканирующую и проточную цитометрию более часто стали использовать для одновременного иммуноцитохимического изучения молекулярных звеньев регуляции и/или инициации апоптоза: функционирования белков семейства Bcl-2, каспаз, протоонкогенов (p53 или pRB). Активное использование методов цитометрии осуществляется с целью оценки функционирования процессов метаболизма митохондрий, окислительного стресса, внутриклеточного pH, транспортировки  $Ca^{2+}$ , что отражено в ряде монографий (Darzynkiewicz Z. et al., 2001; Luther E. et al., 2004; Carey J.L., 2007; Macey M.G., 2007; Robinson J.P., 2008; Yin X.M., Dong Z., 2009) и обзоров (Darzynkiewicz Z. et al., 1994; 1997; 1999; 2001; Cossarizza A. et al., 1994; Majno G., Joris I., 1995; Pozarowsky P. et al., 2006; Koo M.K. et al., 2007; Wijsman J.A. et al., 2007; Peterson R.A. et al., 2008).

Лазерный сканирующий цитометр, являясь многомодульной конструкцией, включает цифлоориметр на базе светоптического микроскопа, совмещенного с устройством для цитометрии и системой визуализации изображения в едином блоке (Kamentsky L.A. et al., 1997; Darzynkiewicz Z. et al., 1999; Kamentsky L.A., 2001). Флуоресценция клеток в условиях проведения лазерной сканирующей цитометрии возбуждается благодаря лазерным излу-

чателю ( $\geq 1$ ) и может оцениваться в четырех спектральных областях видимого диапазона.

Светооптический микроскоп является важным элементом лазерного сканирующего цитометра и обеспечивает работу механических и оптических узлов. Световые потоки от двух лазеров (аргонового и гелий-неонового) пространственно совмещены и отражаются зеркальной призмой непосредственно на контролируемое компьютером поворотное зеркало, после которого световой поток через оптический тракт эпиобъектива поступает на образец. Позиционирование подложки с образцом биологического материала мониторируется сенсорными, расположенными на управляемом компьютером предметном столике микроскопа, который перемещается перпендикулярно лазерному лучу в режиме пошагового (0,5 мкм) сканирования. Рассеянный свет через объектив собирается конденсорной линзой, а его интенсивность фиксируется сенсорными устройствами. Поток флуоресценции собирается линзой объектива и частично поступает на CCD-камеру с целью его визуализации. Другая часть потока флуоресценции направляется через сканирующую линзу и через серию зеркальных отражателей и оптических фильтров и поступает на фотодетекторы. Каждый фотодетектор регистрирует свечение в специфической области (красной, зеленой, оранжевой, ближней инфракрасной). Ламповый источник света обеспечивает общую освещенность объекта для оценки качества изображения через окуляр микроскопа или его регистрации с использованием CCD-камеры.

Важным преимуществом метода является то, что несколько тысяч клеток могут быть одновременно подвержены анализу в течение 1 мин, а единичная клетка может быть перемещена (в процессе или после визуальной инспекции) для углубленного инструментального исследования (Luther E., Kamensky L.A., 1996; Bedner E. et al., 1997; 1998; 1999; 2000; Darzynkiewicz Z., Bedner E., 2001; Pozarowsky P. et al., 2006; Koo M.K. et al., 2007). В связи с необходимостью неоднократного повторного обращения к исследованию оптических характеристик морфологических изменений единичной клетки для идентификации апоптоза опция клеточного перемещения позволяет проводить индивидуальный морфологический анализ клетки в отдельной ячейке в случаях выявления признаков апоптотического сценария клеточной гибели, не распознающейся в стандартных условиях.

Другим преимуществом лазерной сканирующей цитометрии явилась возможность детектирования изменений внутриклеточной локализации флуоресценции и связанных с этим процессов транслокации клеточных компартментов между цитоплазмой и ядром. Так, активация NF- $\kappa$ B, индуцируемая TNF- $\alpha$ , и последующая транслокация фактора транскрипции в ядро, регистрируемая методом

лазерной сканирующей цитометрии, коррелирует с определенными фазами клеточного цикла (Deptala A. et al., 1998; Darzynkiewicz Z. et al., 2001; Darzynkiewicz Z., Bedner E., 2001; Kamensky L.A., 2001; Luther E. et al., 2004). В других экспериментах показано, что транслокация проапоптотического Вах-белка от ядра к митохондриям в процессе апоптоза взаимосвязана с клеточным циклом (Kroemer G., 1998; Darzynkiewicz Z. et al., 2001; Darzynkiewicz Z., Bedner E., 2001).

Интересно отметить, что характерной особенностью лазерной сканирующей цитометрии явилась возможность изучения клеточной топологии, связанная с выявлением максимума пиксель-ассоциированной флуоресценции ДНК, отражающей взаимозависимость ДНК-связанной гиперхромии с конденсацией хроматина, которая в определенной мере может характеризовать процессы митоза или апоптоза (Luther E., Kamensky L.A., 1996; Bedner E. et al., 1997; Furuya T. et al., 1997; Kawasaki M. et al., 1997; Blagosklonny M.V., 2000; Auld D.S. et al., 2006).

Лазерная сканирующая цитометрия также включает последовательный анализ молекулярных событий в единичной клетке благодаря возможности регистрации специфических полос поглощения при оценке функциональных проб на изменение трансмембранного потенциала митохондрий ( $\Delta\psi_m$ ), внутриклеточного pH или содержания активных форм кислорода, а также других клеточных реакций (активации каспаз, возникновения однонитчатых разрывов ДНК) в отдельные фазы клеточного цикла при апоптозе (Li X., Darzynkiewicz Z., 1999; Darzynkiewicz Z., Bedner E., 2001; Darzynkiewicz Z. et al., 2006; 2008).

Выявление функциональных и структурных изменений, происходящих в процессе апоптоза, позволяет оценить молекулярный профиль отдельной апоптотирующей клетки. Метод лазерной сканирующей цитометрии, с одной стороны, делает возможной регистрацию предпосылок к развивающейся апоптотической гибели клеток, а с другой — оптимизирует непосредственное изучение динамики последующих апоптотических клеточных событий (Li X., Darzynkiewicz Z., 1999; Auld D.S. et al., 2006).

Проведение лазерной сканирующей цитометрии отчетливо показывает, что в период индукции апоптотического сценария начальных событий клеточной гибели активация каспаз происходит независимо от альтернативных изменений трансмембранного потенциала митохондрий (Li X. et al., 2000). Следует отметить, что в отличие от проточной цитометрии, возможность выявления небольшого уменьшения клеточного объема (вследствие влияния процедуры окраски и последующего изучения клеточного цикла, с прикреплением клеток к подложке) относит метод лазерной сканирующей цитометрии к более чувствительным и крайне пригодным при необходимости для анализа гипотензивных потоков.

### Анализ изменений клеточной морфологии

Остановившись на отдельных особенностях определения изменений клеточной морфологии при апоптозе методом лазерной сканирующей цитометрии, необходимо отметить следующее. Процесс дегидратации, который лидирует в сморщивании клетки, характеризует ранние события в апоптозе (Kerr J.F. et al., 1972; Arends M.J. et al., 1990; Залесский В.Н. и соавт., 2005а, 2005б; Залесский В.Н., Дынник О.Б., 2005, 2006; Macey M.C., 2007). В то время как конденсация хроматина и структур цитозоля, а также последующая фрагментация ядра связаны с активацией каспаз (Blagosklonny M.V., 2000; Фильченков А.А., Залесский В.Н., 2002; 2003; Залесский В.Н., Дынник О.Б., 2003; Залесский В.Н. и соавт., 2003).

Отличительные особенности развития имеет некротический сценарий клеточной гибели, который связан с инициацией набухания (swelling) клетки в процессе повреждения ее мембраны и последующего лизиса (Kerr J.F., 1972; Darzynkiewicz Z. et al., 1992; Majno G., Joris I., 1995). Данные изменения доступны для изучения с помощью стандартной процедуры лазерной сканирующей, а также проточной цитометрии.

При осуществлении методики проточной цитометрии анализ светорассеяния в момент пересечения апоптотирующими клетками траектории светового потока позволяет выявить изменения в клеточной структуре: снижение интенсивности светорассеяния, обусловленное нарушениями рефрактивных и рефлективных характеристик клетки, а также такими явлениями, как оптическая негомогенность потока, что является результатом процессов конденсации цитоплазмы или ядра с элементами гранулярности структур клеточного компартамента.

Снижение интенсивности светорассеяния отмечено на ранних стадиях апоптотического процесса вследствие сморщивания цитоплазмы клетки (Swat W. et al., 1991; Ormerod M.G. et al., 1995). Исходно выявляются незначительные изменения светорассеяния, хотя отдельными авторами в эти периоды отмечено интермиттирующее повышение интенсивности светорассеяния (Swat W. et al., 1991). По мере развития апоптоза апоптотирующие клетки уменьшаются в размерах и интенсивность светорассеяния неуклонно снижается. На отсроченных этапах развития апоптоза выявляется картина заметного снижения интенсивности сигналов светорассеяния апоптотирующими клетками.

На контрасте с апоптозом клеточное набухание, характерное для ранних стадий некротического сценария клеточной гибели, определяет постоянно перемежающееся повышение светорассеяния. Деградация клеточной мембраны в процессе некроза и резкое повышение ее проницаемости хорошо коррелирует с заметным снижением интенсивности сигналов светорассеяния.

Следует отметить, что изменения светорассеяния не являются специфическими маркерами при развитии любой формы клеточной гибели. Механическая травма клеток, изолирование ядер или клеточный детрит могут способствовать появлению аналогичных изменений светорассеяния в процессе развития как апоптотической, так и некротической гибели клетки. Поэтому анализ светорассеяния следует совмещать с другими методами, обеспечивающими тонкую идентификацию молекулярного профиля клеточной гибели.

Молекулы ДНК, находящиеся в участках конденсирования хроматина апоптозирующей клетки, «оттеняются» высокой интенсивностью (гиперхромазия) ядерной зоны, что напоминает картину визуализации интерфазных ядерных ДНК в неапоптозирующих клетках. Для детектирования этих различий существует такая опция, как «максимальная пиксельзависимая флуоресценция молекул ДНК» в условиях проведения лазерной сканирующей цитометрии (Figuera T. et al., 1997; Bedner E. et al., 2000). Однако известно, что ДНК в конденсированном хроматине митотических и ранних постмитотических клеток также высокоинтенсивно оттеняет клеточное ядро (Luther E., Kamentsky L.A., 1996; Kawasaki M. et al., 1997), что может служить причиной появления артефактов.

#### Анализ трансмембранного потенциала митохондрий

Существенная роль митохондрий в апоптозе связывается с высвобождением двух важных трансмембранных белков: цитохрома С и апоптоз-индуцирующего фактора (AIF — apoptosis-inducing factor). Цитохром С необходим для активации прокаспазы-9 (Liu X. et al., 1996; Yang J. et al., 1997; Залесский В.Н. и соавт., 2006), в то время как AIF участвует в протеолитической активации апоптазоассоциированной эндонуклеазы. Диссипативные изменения трансмембранного потенциала митохондрий ( $\Delta\psi_m$ ) свидетельствуют о возникновении ранних апоптотических событий в клетке (Cossarizza A. et al., 1994; Kroemer G. et al., 1998; Li X. et al., 2000; Залесский В.Н. и соавт., 2004). Изменение  $\Delta\psi_m$  может предшествовать высвобождению цитохрома С и последующей активации каспаз. Однако эти и другие важные вопросы, связанные с особенностями апоптозирующих клеток, остаются дискуссионными до настоящего времени (Li X. et al., 2000; Yin X.M., Dong Z., 2009).

Тем не менее, изменение  $\Delta\psi_m$  подвержено интенсивным исследованиям при анализе апоптотических событий клеточной гибели. Проточная цитометрия является методом выбора для анализа  $\Delta\psi_m$  как в одиночных клетках, так и в изолированных митохондриях. Мембрано-связанные липофильные катионные флуорохромы, в частности родамин 123 (Rh123) или 3,3'-диэтилсалицилкарбоцианин (DiOC<sub>3</sub>) (Bedner E. et al., 1997) применялись в качестве молекул-зондов для выявления  $\Delta\psi_m$  (Johnson L.V. et al., 1980; Shapiro H.M., 2003; Robinson J.P., 2008)

благодаря их способности накапливаться в митохондриях, что позволяет проводить анализ (по уровню интенсивности флуоресценции) изменений  $\Delta\psi_m$ . В частности, комбинированная обработка (Rh123 и DiOC<sub>3</sub>) флуорофорами позволила оценить клеточную выживаемость, имеющую отличительные различия между интактными структурами и клетками, окрашенными только Rh123 (зеленая флуоресценция), а также между мертвыми и гибнущими клетками, содержащими интегрированную в их мембрану флуоресцентную метку. Применение DiOC<sub>3</sub> (красная флуоресценция) обусловило более выраженное свечение клеток с ранними проапоптотическими событиями по сравнению с Rh123 (Darzynkiewicz Z. et al., 1994). Однако специфичность метода с использованием Rh123 и DiOC<sub>3</sub> в качестве  $\Delta\psi_m$ -выявляемых соединений несколько повышалась при использовании флуорохромов в низких концентрациях.

Еще одним флуорохромом, предназначенным для выявления  $\Delta\psi_m$ , является образующее агрегаты липофильное катионное соединение 5,5', 6,6'-тетрахлоро-1,1', 3,3'-тетраэтилбензимидазолкарбоцианин йодид (JC-1). Его накопление в обработанных им митохондриях способствует выявлению  $\Delta\psi_m$ , благодаря изменению цвета флуоресценции от зеленого (характеризующего его мономерную форму) до оранжевого (фиксирующего агрегацию его молекул в митохондриях) (Cossarizza A. et al., 1994), с обратной реверсией цвета флуоресценции при нарушениях трансмембранного потенциала митохондрий в апоптозирующей клетке.

#### Определение фосфатидилсерина на поверхности плазматической мембраны

В интактных клетках фосфолипиды плазматической мембраны отличаются асимметричным распределением: фосфатидилхолин и сфингомиелин расположены на наружной поверхности липидного бислоя, в то время как фосфатидилсерин локализован на его внутренней поверхности. В процессе апоптоза эта асимметрия нарушается (Fadok V.A. et al., 1992; van Engeland M. et al., 1998; Залесский В.Н., Дынник О.Б., 2006) и фосфатидилсерин появляется на поверхности мембраны клетки. Известный белок-антикоагулянт аннексин V отличается способностью присоединяться к молекулам фосфатидилсерина с высокой аффинностью (van Engeland M. et al., 1998; Залесский В.Н. и соавт., 2004). Поэтому молекулярный комплекс флуорохром-конъюгированный аннексин V в качестве метки довольно часто используется в лазерной сканирующей и проточной цитометрии (Darzynkiewicz Z. et al., 2001; Darzynkiewicz Z., Bedner E., 2001; Carey J.L., 2007; Robinson J.P., 2008).

Апоптотические клетки взаимодействуют с аннексином V до того, как повышается проницаемость плазматической мембраны к катионным красителям, в частности PI (propidium iodide). Комбинированная окраска аннексин V-FITC и PI позволя-

ет идентифицировать неапоптотические клетки (при сочетании аннексин V-негативные/PI-негативные), ранние проапоптотические изменения (при сочетании аннексин V-позитивные/PI-негативные) и поздние или отсроченные варианты клеточной гибели (PI-позитивные клетки) (Bedner E. et al., 2000).

#### Анализ фрагментации ДНК

Во время апоптоза под действием эндонуклеаз происходят многочисленные разрывы нитей ДНК, в результате чего образуется множество ее 3'-концов. Их присутствие в клетках можно определить с помощью модифицированных нуклеотидов (например биотин — dUTR) в реакции ник-мечения, катализируемой ДНК-полимеразой или терминальной дезоксирибонуклеотидтрансферазой — метод «ник-мечения 3'-концов молекул ДНК» (Gavrieli Y. et al., 1992; Березовский В.А. и соавт., 2003; Залесский В.Н. и соавт., 2004).

«Ранние» апоптотические клетки с фрагментацией ДНК, у которых еще отсутствуют или слабо выражены морфологические изменения, характерные для апоптоза, выявляются методом TUNEL (Terminal deoxynucleotid transferase-mediated dUTR nick-end labeling) (Sanders E.J., Wride M.A., 1996; Залесский В.Н. и соавт., 2004). Одна из последних модификаций этого метода позволяет выявить фрагментацию ДНК в образце, содержащем всего 5 нг ДНК, причем чувствительность этого определения более чем в 200 раз превышает таковую при рутинном способе его окраски (Peng L., Lip J.J., 1997).

Выход моно- и олигонуклеотидных фрагментов ДНК из ядра в цитоплазму апоптозирующих клеток можно регистрировать методом ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) с использованием моноклональных антител, специфических для нуклеосомных фрагментов ДНК, содержащихся в лизате апоптотических клеток (Salgame P. et al., 1997). Чувствительность такого метода более чем в 500 раз выше выявления фрагментации ДНК с помощью гель-электрофореза. К существенным преимуществам метода следует отнести возможность одновременного анализа большого количества образцов; к основным недостаткам — то, что пробы должны быть проанализированы немедленно, поскольку хранение может привести к существенному ослаблению реакции.

И, наконец, следует рассмотреть, на что необходимо обратить внимание при выборе метода идентификации апоптоза и его интерпретации? Выбор метода зависит в первую очередь от клеточной популяции, природы индуктора апоптоза, фактора времени (определение в ту или иную фазу клеточного цикла), а также технических ограничений лазерного сканирующего и проточного цитометра. Возможность идентификации апоптозирующих клеток методом проточной цитометрии не всегда легко достижима. Наличие специфических маркеров процесса единичных разрывов ДНК и их количества

в апоптозирующих клетках наряду с интенсивностью их мечения методом TUNEL позволяет обеспечить их позитивную идентификацию (Darzynkiewicz Z. et al., 2008). Однако при определенных условиях внутриклеточная деградация ДНК не возникает (Collins R.J. et al., 1992; Catchpole D.R., Stewart B.W., 1993; Ormerod M.G. et al., 1994), и количество одонитивных разрывов ДНК в таких атипичных апоптозирующих клетках может не позволить адекватно различать их методом TUNEL (Darzynkiewicz Z. et al., 2008).

Хотя гибнущие клетки согласно некротическому сценарию имеют значительное количество одонитивных разрывов ДНК, в ряде случаев наркозависимая фрагментация ДНК может иметь довольно выраженный характер и некротические клетки при этом могут быть трудно отличимы от апоптоических (Gorczyca W., et al., 1992). Макрофаги/моноциты, поглощающие апоптоические тела, слабо визуализируются как TUNEL-позитивные при проведении точной цитометрии и хорошо различаются при проведении лазерной сканирующей цитометрии (Bedner E. et al., 1999; Darzynkiewicz Z. et al., 2008).

Активация каспаз в последнее время стала рассматриваться в качестве специфического маркера программированной клеточной гибели — апоптоза (Blagosklonny M.V., 2000; Залеский В.Н. и соавт., 2004; Yin X.M., Dong Z., 2009). Однако каспазы могут быть активированы и в неапоптозирующих клетках, например в процессе митогенной стимуляции лимфоцитов (Zapata J.M. et al., 1998; Kennedy N.J. et al., 1999). Интерпретация процесса аннексин V-зависимого взаимодействия в качестве специфического для апоптоза также может рассматриваться как неоднозначная в результате нарушения целостности плазматической мембраны из-за отклонений в процессе цитометрии или — от условий хранения материала. Подобно результатам, полученным методом TUNEL, макрофаги и другие клетки, поглотившие апоптоические тела, могут также становиться аннексин V-позитивными и визуализироваться с помощью лазерной сканирующей цитометрии (Marquet D. et al., 1999).

## Литература

**Березовский В.А., Дынник О.Б., Залеский В.Н.** (2003) Методы диагностики апоптоз-зависимых состояний. Лікування та діагностика, 4: 57–60.

**Залеский В.Н., Дынник О.Б.** (2003) Апоптоз-зависимая дисфункция эндотелия и атеросклероз. Кровообіг та гемостаз, 2: 22–28.

**Залеский В.Н., Дынник О.Б.** (2005) Апоптоз и инфаркт миокарда: роль стволовых клеток в регенерации мышцы сердца. Укр. кардіол. журн, 3: 27–132.

**Залеский В.Н., Дынник О.Б.** (2006) Молекулярно-генетические основы апоптозассоциированных заболеваний сердечно-сосудистой системы и принципы их лечения (обзор литературы). Журн. АМН України, 12(2): 307–326.

**Залеский В.Н., Стаднюк Л.А., Великая Н.В.** (2003) Апоптоический и аутофагический пути гибели клетки при гипертрофии и ремоделировании миокарда (обзор литературы и собственных исследований). Журн. АМН України, 9(4): 699–712.

**Залеский В.Н., Фильченков А.А., Дынник О.Б.** (2004) Методы визуализации апоптоза (обзор литературы и собственных исследований). Журн. АМН України, 10(2): 326–338.

**Залеский В.Н., Дынник О.Б., Гавриленко Т.И.** (2005b) Апоптоз кардиомиоцитов, цитокины и ремоделирование миокарда на фоне развития хронической сердечной недостаточности. Лік. справа, Врачеб. дело, 5: 3–10.

**Залеский В.Н., Дынник О.Б., Фильченков А.А.** (2005a) Кардиолипин мембран митохондрий в контроле апоптоза кардиомиоцитов при ишемии миокарда и старении. Проблемы старения и долголетия, 14(2): 185–197.

**Залеский В.Н., Дынник О.Б., Фильченков А.А.** (2006) Современные терапевтические подходы для направленной регуляции апоптоза (обзор литературы). Журн. АМН України, 12(4): 634–652.

**Фильченков А.А., Залеский В.Н.** (2002) Апоптоз кортикальных нейронов при развитии ишемических инсультов. Нейрофизиология, 34(6): 468–484.

**Фильченков А.А., Залеский В.Н.** (2003) Прижизненная неинвазивная визуализация апоптоза: состояние и перспективы исследований (обзор литературы). Мед. визуализация, 3: 126–132.

**Arends M.J., Morris R.G., Wyllie A.H.** (1990) Apoptosis. The role of the endonuclease. Am. J. Pathol., 136(3): 593–608.

**Auld D.S., Johnson R.L., Zhang Ya. et al.** (2006) Fluorescent protein-based cellular assays analyzed by laser-scanning microplate cytometry. In: J. Inglese (Ed.) Methods in enzymology, Vol. 414, Measuring biological responses with automated microscopy. Academic Press, New York, p. 566–587.

**Bedner E., Burfeind P., Gorczyca W. et al.** (1997) Laser scanning cytometry distinguishes lymphocytes, monocytes, and granulocytes by differences in their chromatin structure. Cytometry, 29(3): 191–196.

**Bedner E., Melamed M.R., Darzynkiewicz Z.** (1998) Enzyme kinetic reactions and fluorochrome uptake rates measured in individual cells by laser scanning cytometry. Cytometry, 33(1): 1–9.

**Bedner E., Li X., Gorczyca W. et al.** (1999) Analysis of apoptosis by laser scanning cytometry. Cytometry, 35(3): 181–195.

**Bedner E., Li X., Kunicki J., Darzynkiewicz Z.** (2000) Translocation of Bax to mitochondria during apoptosis measured by laser scanning cytometry. Cytometry, 41(2): 83–88.

**Blagosklonny M.V.** (2000) Cell death beyond apoptosis. Leukemia, 14(8): 1502–1508.

**Bollmann R., Méhes G.** (2004) Analysis of tissue imprints by scanning laser cytometry. Curr. Protoc. Cytom., Chap. 7: Unit 7. 22.

**Catchpole D.R., Stewart B.W.** (1993) Etoposide-induced cytotoxicity in two human T-cell leukemia lines: delayed loss of membrane permeability rather than DNA fragmentation as an indicator of programmed cell death. Cancer Res., 53(18): 4287–4296.

**Carey J.L., McCoy J.P., Keren D.** (Eds.). (2007) Flow cytometry in clinical diagnosis. ASCP Press, Chicago, IL, 384 p.

**Collins R.J., Harmon B.V., Gobé G.C., Kerr J.F.** (1992) Internucleosomal DNA cleavage should not be the sole criterion for identifying apoptosis. Int. J. Radiat. Biol., 61(4): 451–453.

**Cossarizza A., Kalashnikova G., Grassi L. et al.** (1994) Mitochondrial modifications during rat thymocyte apoptosis: a study at the single cell level. Exp. Cell Res., 214(1): 323–330.

**Darzynkiewicz Z., Bruno S., Del Bino G. et al.** (1992) Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. Cytometry, 13(8): 795–808.

**Darzynkiewicz Z., Li X., Gong J.** (1994) Assays of cell viability: discrimination of cells dying by apoptosis. Methods Cell Biol., 41: 15–38.

**Darzynkiewicz Z., Juan G., Li X. et al.** (1997) Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). Cytometry, 27(1): 1–20.

**Darzynkiewicz Z., Bedner E., Li X. et al.** (1999) Laser-scanning cytometry: A new instrumentation with many applications. Exp. Cell Res., 249(1): 1–12.

**Darzynkiewicz Z., Bedner E.** (2000) Analysis of apoptotic cells by flow and laser scanning cytometry. Methods Enzymol., 322: 18–39.

**Darzynkiewicz Z., Cressman H.A., Robinson J.P.** (Eds.) (2001) Cytometry, Third Edition. Methods in Cell Biology, Vol. 63–64. Academic, San Diego, CA

**Darzynkiewicz Z., Bedner E., Smolewski P.** (2001) Flow cytometry in analysis of cell cycle and apoptosis. Semin. Hematol., 38(2): 179–193.

**Darzynkiewicz Z., Li X., Bedner E.** (2001) Use of flow and laser-scanning cytometry in analysis of cell death. Methods Cell Biol., 66: 69–109.

**Darzynkiewicz Z., Huang X., Okafuji M.** (2006). Detection of DNA strand breaks by flow and laser scanning cytometry in studies of apoptosis and cell proliferation (DNA replication). Methods Mol. Biol., 314: 81–93.

**Darzynkiewicz Z., Galkowski D., Zhao H.** (2008) Analysis of apoptosis by cytometry using TUNEL assay. Methods, 44(3): 250–254.

**Deptala A., Bedner E., Gorczyca W., Darzynkiewicz Z.** (1998) Activation of nuclear factor kappa B (NF-kappaB) assayed by laser scanning cytometry (LSC). Cytometry, 33(3): 376–382.

**Fadok V.A., Voelker D.R., Campbell P.A. et al.** (1992) Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. J. Immunol., 148(7): 2207–2216.

**Furuya T., Kamada T., Murakami T. et al.** (1997) Laser scanning cytometry allows detection of cell death with morphological features of apoptosis in cells stained with PI. Cytometry, 29(2): 173–177.

**Galbavy S., Kulliffay P.** (2008) Laser scanning cytometry (LSC) in pathology — a perspective tool for the future? Bratisl. Lek. Listy, 109(11): 3–7.

**Gorczyca W., Bruno S., Darzynkiewicz Z. et al.** (1992) DNA strand breaks occurring during apoptosis: their early in situ detection by the terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays and prevention by serine protease inhibitors. Int. J. Oncol., 1: 639–648.

**Gavriel Y., Sherman Y., Ben-Sasson S.A.** (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. J. Cell Biol., 119(3): 493–501.

**Hara S., Halicka H.D., Bruno S. et al.** (1996) Effect of protease inhibitors on early events of apoptosis. Exp. Cell Res., 223(2): 372–384.

**Hammett M.M.** (2007) Laser scanning cytometry: understanding the immune system in situ. Nat. Rev. Immunol., 7(11): 897–904.

**Holme A.L., Yadav S.K., Pervaiz S.** (2007) Automated laser scanning cytometry: a powerful tool for multi-parameter analysis of drug-induced apoptosis. Cytometry A, 71(2): 80–86.

**Johnson L.V., Walsh M.L., Chen L.B.** (1980) Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77(2): 990–994.

**Kamentsky L.A., Burger D.E., Gershman R.J. et al.** (1997) Slide-based scanning DNA cytometry. Acta Cytol., 41(1): 123–143.

**Kamentsky L.A.** (2001). Laser scanning cytometry. Methods Cell Biol., 63: 51–87.

**Kawasaki M., Sasaki K., Satoh T. et al.** (1997) Laser scanning cytometry (LCS) allows detailed analysis of the cell cycle in PI stained human fibroblasts (TIG-7). Cell Prolif., 30(3–4): 139–147.

**Kennedy N.J., Kataoka T., Tschopp J., Budd R.C.** (1999) Caspase activation is required for T cell proliferation. J. Exp. Med., 190(12): 1891–1896.

**Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R.** (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br. J. Cancer, 26(4): 239–257.

**Koo M.K., Oh C.H., Holme A.L., Pervaiz S.** (2007) Simultaneous analysis of steady-state intra-

cellular pH and cell morphology by automated laser scanning cytometry. *Cytometry A*, 71(2): 87–93.

Kroemer G. (1998) The mitochondrion as an integrator/coordinator of cell death pathways. *Cell Death Differ.*, 5(6): 547.

Luther E., Kamentzky L.A. (1996) Resolution of mitotic cells using laser scanning cytometry. *Cytometry*, 23(4): 272–278.

Lenz D., Lenk K., Mittag A. et al. (2005) Detection and quantification of endothelial progenitor cells by flow and laser scanning cytometry. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*, 19(3–4): 180–187.

Li X., Darzynkiewicz Z. (1999) The Schrödinger's cat quandary in cell biology: integration of live cell functional assays with measurements of fixed cells in analysis of apoptosis. *Exp. Cell Res.*, 249(2): 404–412.

Li X., Du L., Darzynkiewicz Z. (2000) During apoptosis of HL-60 and U-937 cells caspases are activated independently of dissipation of mitochondrial electrochemical potential. *Exp. Cell Res.*, 257(2): 290–297.

Li X., Kim C.N., Yong J. et al. (1998) Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*, 86(1): 147–157.

Luther Ed., Kamentzky L., Henriksen M. et al. (2004) Next-generation laser scanning cytometry. In: Z. Darzynkiewicz, M. Roederer, H.J. Tanke (Eds.) *Cytometry: new developments*, Volume 75, Fourth Edition (Methods in Cell Biology). Academic Press, New York, p. 186–220.

Macey M.G. (Ed.) (2007). *Flow cytometry: principles and application*. Humana Press, Totowa, 290 p.

Majno G., Jorja I. (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol.*, 146(1): 3–15.

Marguet D., Luciani M.F., Moynault A. et al. (1999). Engulfment of apoptotic cells involves the redistribution of membrane phosphatidylserine on phagocyte and prey. *Nat. Cell Biol.*, 1(7): 454–456.

Ormerod M.G., O'Neill C.F., Robertson D., Herrap K.R. (1994). Cisplatin induces apoptosis in a human ovarian carcinoma cell line without concomitant internucleosomal degradation of DNA. *Exp. Cell Res.*, 211(2): 231–237.

Ormerod M.G., Paul F, Cheetham M., Sun X.M. (1995) Discrimination of apoptotic thymocytes by forward light scatter. *Cytometry*, 21(3): 300–304.

Peng L., Liu J.J. (1997) A novel method for quantitative analysis of apoptosis. *Lab. Invest.*, 77(6): 547–555.

Peterson R.A., Krull D.L., Butler L. (2008) Applications of laser scanning cytometry in immunohistochemistry and routine histopathology. *Toxicol. Pathol.*, 36(1): 117–132.

Pozarowski P., Holden E., Darzynkiewicz Z. (2008) Laser scanning cytometry: principles and applications. *Methods Mol. Biol.*, 318: 165–182.

Robinson J.P. (Ed.). (2008) *Handbook of flow cytometry methods*, Wiley-Liss, New York, 260 p.

Salgame P., Varadhachary A.S., Primalno L.L. et al. (1997) An ELISA for detection of apoptosis. *Nucleic Acids Res.*, 25(3): 680–681.

Sanders E.J., Wride M.A. (1996) Ultrastructural identification of apoptotic nuclei using the TUNEL technique. *Histochem. J.*, 28(4): 275–281.

Shapiro H.M. (Ed.). (2003) *Practical Flow Cytometry*, 4 ed, John Wiley & Sons Inc., New York, 736 p.

Swat W., Ignatowicz L., Kisielow P. (1991) Detection of apoptosis of immature CD4+8+ thymocytes by flow cytometry. *J. Immunol. Methods*, 137(1): 79–87.

Szokvolgyi L., Imre L., Minh D.X. et al. (2009) Flow cytometric and laser scanning microscopic approaches in epigenetics research. *Methods Mol. Biol.*, 567: 99–111.

Takahashi H., Ruiz P., Ricordi C. et al. (2009) In situ quantitative immunoprofiling of regulatory T cells using laser scanning cytometry. *Transplant. Proc.*, 41(1): 238–239.

van Engeland M., Nieland L.J., Ramaekers F.C. et al. (1998) Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry*, 31(1): 1–9.

Wijman J.A., Ober L.A., Paulissen J. et al. (2007) A practical method to determine the amount of tissue to analyze using laser scanning cytometry. *Cytometry A*, 71(7): 501–508.

Yong J., Liu X., Bhalla K. et al. (1997) Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science*, 275(5303): 1129–1132.

Yin X.M., Dong Z. (Eds.). (2009) *Essentials of apoptosis: a guide for basic and clinical research*, Humana Press Inc., Totowa NJ, 707 p.

Zapata J.M., Takahashi R., Salvanes G.S., Reed J.C. (1998). Granzyme release and caspase

activation in activated human T-lymphocytes. *J. Biol. Chem.*, 273(12): 6916–6920.

## Молекулярна діагностика: лазерна скануюча й проточна цитометрія в дослідженні апоптозу

**В.М. Залеський**

**Резюме.** Огляд присвячено обговоренню діагностичного значення методів аналізу (лазерна скануюча й проточна цитометрія) апоптозозалежних станів. Наведено результати основних досліджень щодо цього питання.

**Ключові слова:** лазерна скануюча цитометрія, проточна цитометрія, апоптоз, молекулярна діагностика.

## Molecular diagnostics: laser-scanning and flow cytometry in the analysis of apoptosis

**V.N. Zalessky**

**Summary.** The review is dedicated to discussion of diagnostic importance of the laser scanning and flow cytometry methods in the analysis on events of apoptosis. The results of the important trials regarding this question are provided.

**Key words:** laser scanning cytometry, flow cytometry, apoptosis, molecular diagnostics.

### Адрес для переписки:

Залеський Вячеслав Николаевич  
03151, Київ, ул. Народного ополчення, 5  
Національний научний центр  
«Інститут кардіології імені  
академіка Н.Д. Стражеско» НАМН України

## Реферативна інформація

### HBV-інфекція підвищує ризик розвитку неходжкінської лимфому

По матеріалам [www.thelancet.com](http://www.thelancet.com)



У пацієнтів з хронічним гепатитом В чаще діагностують дифузну В-клеточну лимфомули другої тип неходжкінських лимфом (НХЛ), а також намірно підвищується ризик розвитку іммунопроліферативних захворювань, чем у пацієнтів з отрицательной пробой на HBsAg. Об этом свидетельствуют данные, полученные в ходе исследований по профилактике рака, проведённых в Кореи. HBV-инфекция была эндемична для Южной Кореи до 1995 г., далее введена всеобщая вакцинация новорожденных против гепатита В. До этого у 7% жителей Южной Кореи пробы на наличие HBsAg были положительными, что является индикатором хронического гепатита В.

Прованализированные данные свидетельствуют о том, что 53 045 обследованных людей имеют положительные пробы на наличие HBsAg. В-клеточная лимфома диагностирована

у 133 лиц с хроническим гепатитом В, а также у 905 пациентов с отрицательным анализом на антитела к HBsAg. Заболеваемость составила 19,4 случая на каждые 100 тыс. человек в группе с положительной пробой, и 12,3 случая на каждые 100 тыс. человек в группе с отрицательной пробой.

При этом исследователи не выявили связи между хроническим гепатитом В и развитием фолликулярной или Т-клеточной лимфомы, лимфомы Ходжкина, множественной миеломы и других видов лейкемии.

Предполагают, что хронический гепатит В и НХЛ связаны хронической стимуляцией клеток иммунной системы на фоне персистенции вируса в гепатоцитах. Постоянная активация лимфоцитов может приводить к мутациям ДНК, что способствует их пролиферации и развитию лимфом.

«Дополнительный контроль случаев заболевания и групповые обследования необходимы для повторных исследований остальных групп населения, они помогут оценить связь развития других подтипов лимфом с гепатитом В, — говорит доктор Сун Ха Джи (Sun Ha Jee), Университет Ёнсе, Сеул, Южная Корея (Yonsei University, Seoul, South Korea). — Очень важна своевременная диагностика и лечение гепатита В, что снижает риск развития неходжкінских лимфом. В свою очередь, лечение гепатита В может привести к ремиссии заболевания у лиц с лимфомой».