

УДК: 616.155.392.8-036.12:616.419

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АПОПТОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ МИЕЛОЛЕЙКОЗОМ (ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ МИКРОСКОПИЯ И ПРОТОЧНАЯ ЦИТОМЕТРИЯ)**

<sup>2</sup>Бессмельцев С.С., <sup>1</sup>Козлов А.В., <sup>1</sup>Сяпина Т.В., <sup>2</sup>Удальева В.Ю.

<sup>1</sup>ГОУ ВПО «Санкт-Петербургская медицинская академия последипломного образования Росздрава», Санкт-Петербург, e-mail: kafedrabb@mail.ru;

<sup>2</sup>ФГУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии», Санкт-Петербург, e-mail: RNIHT@mail.ru

Проведена сравнительная оценка результатов измерения апоптоза в клетках костного мозга больных хроническим миелолейкозом в условиях индукции двумя методами: флуоресцентной микроскопией и проточной цитометрией. Микроскопия выполнена с применением красителя акридин оранж. Проточная цитометрия выполнена с применением аннексина V и пропидий йодида. В исследование включены две группы больных: группа больных в хронической фазе с полным или частичным цитогенетическим ответом и группа больных в фазе бластного криза. В условиях индукции у больных в хронической фазе обнаружена высокая апоптотическая активность клеток костного мозга, у больных в фазе бластного криза – низкая. Выявлена высокая сопоставимость результатов оценки апоптотических реакций в клетках костного мозга при определении методом флуоресцентной микроскопии и проточной цитометрии.

**Ключевые слова:** апоптоз, хронический миелолейкоз, флуоресцентная микроскопия, акридин оранж, проточная цитометрия, аннексин V

**COMPARATIVE EVALUATION OF METHODS FOR DETECT OF APOPTOTIC ACTIVITY BONE MARROW CELLS AT PATIENTS WITH CHRONIC MYELOGENOUS LEUKEMIA (FLUORESCENCE MICROSCOPY AND FLOW CYTOMETRY)**

<sup>2</sup>Bessmeltsev S.S., <sup>1</sup>Kozlov A.V., <sup>1</sup>Syasina T.V., <sup>2</sup>Udalieva V.U.

<sup>1</sup>St-Petersburg Medical Academy of Postgraduate Studies, Russia; St-Petersburg, e-mail: kafedrabb@mail.ru;

<sup>2</sup>Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, St-Petersburg, e-mail: RNIHT@mail.ru

In this report, we describe relative evaluation investigation of apoptosis in bone marrow cells at patients with chronic myelogenous leukemia (CML) measured by two methods: fluorescence microscopy and flow cytometry. The microscopy was conducted using the acridine orange. The flow cytometry were conducted using the Annexin V and propidium iodide. In study it is included two groups of patients: group of patients in a chronic phase with the complete or partial cytogenetic response and group of patients in a blastic phase of CML. In the conditions of an induction apoptosis at patients in a chronic phase it is found out high apoptotic activity cells of bone marrow, in patients in a blastic phase – low. High comparability of results estimation apoptotic reactions in bone marrow cells is revealed at definition by a method of fluorescence microscopy and flow cytometry.

**Keywords:** apoptosis, chronic myelogenous leukemia, fluorescence microscopy, acridine orange, flow cytometry, Annexin V

Апоптоз представляет собой процесс физиологической клеточной смерти, который контролируется генетически и присущ всем клеткам человека [8]. Понимание молекулярных механизмов, вовлеченных в регуляцию апоптоза, способствует выяснению нарушений процессов клеточного роста при различных заболеваниях [7]. Факторы, вовлеченные в регуляцию процесса апоптоза, в настоящее время рассматриваются в качестве основных клеточных мишеней целенаправленной терапии в онкогематологии, а изучение характера апоптотических реакций под ее воздействием может служить лабораторным маркером эффективности и помогать в выборе рациональной химиотерапии [3]. Для качественного и количественного определения направленности апопто-

тических реакций в клетке был предложен ряд методов, позволивших раскрыть многие механизмы, лежащие в основе апоптотической и некротической клеточной смерти.

**Целью настоящего исследования** явилась сравнительная оценка результатов измерения апоптоза в клетках костного мозга больных хроническим миелолейкозом (ХМЛ) в условиях индукции двумя методами: флуоресцентной микроскопией и проточной цитометрией.

**Материалы и методы исследования**

Исследование было проведено на гетерогенной популяции клеток костного мозга (КМ) у больных ХМЛ в хронической фазе (ХФ) (n = 14) – первая группа и в фазе бластного криза (БК) (n = 6) – вторая группа. У больных 1-й группы был получен полный

гематологический ответ и полный или частичный цитогенетический ответ на терапию гливекком. Больные 2-й группы были включены в исследование до начала терапии гливекком. Разделение на группы было проведено на основе цитогенетических и клинико-гематологических данных согласно критериям European Leukemia Net [2].

На момент обследования у больных 1-й группы количество бластных клеток в КМ составило не более  $1,2 \pm 0,7\%$ , а у больных 2-й группы –  $47,1 \pm 11,9\%$ . Количество клеток с Ph(+) хромосомой у больных 1-й группы было в пределах 0-26%. У больных 2-й группы Ph(+) хромосома определялась в 100%.

### 1. Выделение клеток костного мозга

Клетки КМ были выделены с помощью центрифугирования в градиенте плотности раствора фиколл-верографин с относительной плотностью 1,077 г/мл из 2 мл гепаринизированного костномозгового пунктата, полученного при стерильной пункции. После центрифугирования (40 минут при 1500 об./мин) отделяли клеточную фракцию, которую трижды отмывали раствором хлорида натрия 9 г/л. Выделенные клетки суспендировали в среде следующего состава (ммоль/л): NaCl – 119; KCl – 4,69; CaCl<sub>2</sub> – 2,52; MgCl<sub>2</sub> – 1,18; глюкоза – 5,5; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1,18; HEPES – 25; pH = 7,4 с добавлением 60 г/л раствора ЭДТА в соотношении 1/20 от объема костного мозга из расчета 1 мл раствора на 10<sup>6</sup> клеток.

На каждом этапе выделения клеток подсчитывали их количество в камере Горяева и определяли жизнеспособность по связыванию трипанового синего. Жизнеспособные клетки составляли в среднем 92–99% от их общего числа.

### 2. Оценка апоптоза

Интенсивность апоптотических реакций в клетках КМ оценивали двумя методами: флуоресцентной микроскопией и проточной цитометрией.

#### 2.1. Флуоресцентная микроскопия

Интенсивность реакций апоптоза оценивали по количеству клеток, связавших акридин оранж (АО) [1]. На предметное стекло помещали 5 мкл клеточной суспензии, содержащей клетки КМ, смешивали с равным объемом раствора АО (100 мкг/мл), затем накрывали покровным стеклом и просматривали под масляной иммерсией (Микроскоп Leica DM4000B, светофильтр H3). Изображение фиксировали с помощью видеосистемы на основе цифровой камеры. Подсчитывали не менее 100 клеток в разных полях зрения. Количество клеток, связавших АО (АО<sup>+</sup> клетки), выражали в процентах от общего числа.

#### 2.2. Проточная цитометрия

Интенсивность реакций апоптоза оценивали по связыванию клетками КМ двух маркеров – аннексина V

и пропидий йодида (PI) с помощью набора реактивов ANNEXIN V-FITC APOPTOSIS DETECTION KIT I («BD Pharmingen™», США). Результаты выражали в процентах от общего числа клеток. Аннексин V применяли для выявления клеток, вступивших в апоптоз (аннексин V<sup>+</sup> клетки). Пропидий йодид (PI) употребляли в качестве маркера жизнеспособности клеток (аннексин V<sup>-</sup>PI<sup>-</sup> клетки) и клеточного некроза (аннексин V<sup>-</sup>PI<sup>+</sup> клетки). В каждом образце анализировали 10000 клеток. Мононуклеарные клетки костного мозга идентифицировали на основе CD45 флуоресценции. Анализировали недифференцированный клеточный пул по общему лейкоцитарному маркеру CD34 (CD34<sup>+</sup> клетки).

### 3. Индукция апоптоза

Об апоптотической активности клеток КМ судили по разнице в количестве клеток в условиях спонтанного и индуцированного апоптоза. Для оценки спонтанного апоптоза  $4 \cdot 10^6$  клеток инкубировали в 1 мл инкубационной среды. Индукцию апоптоза вызывали дефицитом глюкозы в среде инкубации, помещая то же количество клеток в минимальный объем среды (50 мкл). Количество клеток в состоянии апоптоза определяли после 18-часовой инкубации при температуре +37 °С.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Statistica 6.0. Сравнение было проведено с использованием непараметрического метода Манна-Уитни.

## Результаты исследования и их обсуждение

При изучении клеток в условиях флуоресцентной микроскопии учитывали следующие признаки: размеры ядра, характер распределения хроматина, наличие хроматиновых тел в цитоплазме, характер свечения ДНК. Акридинсвязывающая способность клеток была изучена во всех образцах КМ больных, включенных в 1-ю и 2-ю группы. Полученные данные представлены в табл. 1, из которой видно, что уровень спонтанного апоптоза и индуцированного в клетках КМ у больных ХМЛ в 1-й группе намного выше, чем у больных 2-й группы. Прирост количества АО<sup>+</sup> клеток КМ в условиях индукции апоптоза в 1-й группе более чем в 10 раз превышает их прирост во 2-й группе (9,5 и 0,7% соответственно).

Таблица 1

Связывание акридин оранжа клетками костного мозга при спонтанном и индуцированном апоптозе

Группы больных	Количество клеток костного мозга связывающих АО, %		
	Спонтанный апоптоз	Индуцированный апоптоз	Прирост клеток в условиях индукции
1-я группа	10,9 ± 1,0*	20,4 ± 1,3* **	9,5 ± 0,9*
2-я группа	3,8 ± 0,9	4,5 ± 0,8**	0,7 ± 0,4

Примечания:

\* – достоверность различий  $p < 0,005$  по сравнению со 2-й группой;

\*\* – достоверность различий  $p < 0,005$  по сравнению со спонтанным апоптозом.

Представленные данные указывают на то, что клетки КМ у больных в фазе БК характеризуются низкой апоптотической активностью и способностью вступать в апоптоз в условиях его индукции.

Способность клеток КМ вступать в апоптоз в условиях индукции у больных ХМЛ в ХФ и фазе БК была оценена путем параллельного измерения числа клеток КМ в апоптозе методом проточной цитометрии.

Поскольку целью исследования была сравнительная оценка методов, характеризующих апоптоз в клетках КМ, при проточной цитометрии направленно ана-

лизировали общеклеточный пул (недифференцированный клеточный пул). Способность клеток связывать аннексин V и пропидий йодид была изучена во всех образцах КМ больных, включенных в 1-ю и 2-ю группы. Полученные данные представлены в табл. 2. В 1-й группе количество аннексин V<sup>+</sup> связывающих клеток в условиях спонтанного и индуцированного апоптоза равнялось 14,2 и 23,6% (прирост – 9,8). Во 2-й группе количество аннексин V<sup>+</sup> клеток в условиях спонтанного и индуцированного апоптоза составляло 4,2 и 4,8% соответственно. Прирост числа клеток в состоянии апоптоза составил 0,6%.

**Таблица 2**

Связывание аннексина V клетками костного мозга больных 1-й и 2-й групп при спонтанном и индуцированном апоптозе

Группы	Количество аннексин V <sup>+</sup> клеток, (%)		
	Спонтанный апоптоз	Индуцированный апоптоз	Прирост клеток в условиях индукции
1-я группа	14,2 ± 2,0*	24,0 ± 2,8*. **	9,8 ± 0,9*
2-я группа	4,2 ± 0,6	4,8 ± 0,8**	0,6 ± 0,4

**Примечания:**

\* – достоверность различий  $p < 0,005$  по сравнению со 2-й группой;

\*\* – достоверность различий  $p < 0,005$  по сравнению со спонтанным апоптозом.

Как следует из табл. 2, уровень спонтанного и индуцированного апоптоза в клетках КМ, а также прирост количества клеток в условиях индукции у больных 1-й группы значительно выше соответствующих показателей 2-й группы.

Сравнительную оценку результатов, полученных методом флуоресцентной микроскопии и проточной цитометрии, провели на основании того, что клетки для изучения процессов апоптоза в КМ для обоих методов отбирали из одних и тех же образцов клеточной суспензии.

Аналитическую надёжность методов оценивали, сравнивая количество клеток с признаками апоптоза: АО<sup>+</sup> клетки и аннексин V<sup>+</sup> клетки. В табл. 3 представлены значения коэффициента корреляции ( $r$ ) при сопоставлении результатов, полученных методом флуоресцентной микроскопии и проточной цитометрии.

Значения коэффициента корреляции ( $r$ ) указывают на возможность сравнения результатов, полученных при флуоресцентной микроскопии и проточной цитометрии по количеству клеток в условиях спонтанного и индуцированного апоптоза.

Вопрос оценки способности клеток к апоптозу при различных заболеваниях остается актуальным для решения многих проблем теоретической и практической медицины, в том числе онкогематологии [4].

Изучение процессов апоптоза на клеточных культурах с помощью набора классических биохимических, микроскопических и более современных методов – проточной цитометрии и полимеразной цепной реакции, позволило выявить ряд принципиальных аспектов, касающихся вовлечения апоптоза в процессы гибели опухолевых клеток.

**Таблица 3**

Значения коэффициента корреляции ( $r$ ) при сопоставлении результатов, полученных при определении апоптоза методом флуоресцентной микроскопии и проточной цитометрии

Сравниваемые показатели	Апоптоз	
	Спонтанный	Индукционный
Количество АО <sup>+</sup> клеток, % и аннексин V <sup>+</sup> клеток, %	0,84	0,94

**Примечание.** \* – критерий достоверности  $p < 0,05$ .

Методы с использованием красителя АО – флуорохрома с характерными максимумами флуоресценции в области 530 нм и 640 нм продолжают с успехом применяться для выявления характера апоптотических изменений в различных клетках. Полага-

ют, что данный краситель при встраивании в молекулу ДНК способствует выявлению апоптотических клеток по характерному яркому желто-зеленому свечению ядра. Жизнеспособные клетки обладают диффузной зеленой флуоресценцией. Клетки, подвергшиеся некрозу, характеризуются выраженным красно-оранжевым свечением [5]. Достоинством примененного нами варианта микроскопического метода является простота и невысокая стоимость реактивов, возможность оценки состояния ДНК по характеру свечения и достаточно четких признаков, подтверждающих факт необратимого вступления клетки в процесс апоптоза. Применение профессионального лабораторного микроскопа Leica DM4000B, оснащенного видеосистемой, позволило нам избежать субъективизма в оценке микроскопической картины, характерного для визуальной оценки.

Метод проточной цитометрии с использованием рекомбинантного аннексина V – белка, конъюгированного с флуорохромом, служит одним из наиболее быстрых и эффективных методов обнаружения апоптотических клеток [6]. При использовании дополнительного красителя – пропидий иодида (PI), метод позволяет одновременно определять интактные клетки, клетки, находящиеся в апоптозе и клетки в состоянии некроза.

К достоинствам данного метода относятся: возможность более раннего обнаружения инициации апоптоза в клетке, подсчет большего количества клеток, надежная стандартизация метода за счет наличия промышленно выпускаемых тест-систем и сертифицированных контрольных материалов.

Таким образом, полученные нами данные указывают на сопоставимость результатов оценки апоптотических реакций в клетках костного мозга. Вполне очевидно, что в клинической практике для изучения направленности апоптотических реакций в клетках предпочтение следует отдавать проточной цитометрии вследствие высокой стандартизации метода. В эксперимен-

тальных исследованиях микроскопический метод, использующий не только **акридиновый оранжевый**, но и другие флуоресцирующие красители, сохраняют свою актуальность.

#### Список литературы

1. Зими́на В.А. Особенности апоптотической активности клеток костного мозга у больных неходжкинскими злокачественными лимфомами: дис. ... канд. мед. наук. – СПб., 2003. – С. 61–62, 78–79.
2. Chronic Myeloid Leukemia: An Update of Concepts and Management Recommendations of European Leukemia Net / M. Baccarani, G. Cortes, et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2009. – Vol. 27. – P. 6041–6051.
3. Endometrial carcinoma in vitro chemosensitivity testing of single and combination chemotherapy regimens using the novel microculture kinetic apoptosis assay: implications for endometrial cancer treatment / K.S. Ballard, H.D. Homesley, C. Hodson et al. // *J. Gynecol. Oncol.* – 2010. – Vol. 21, № 1. – P. 45–49.
4. Tracking infrared signatures of drugs in cancer cells by Fourier transform microspectroscopy / G. Bellisola, M. Della Peruta, M. Vezzalini et al. // *Analyst.* – 2010. – Vol. 135, № 12. – P. 3077–3086.
5. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry / Z. Darzynkiewicz, S. Bruno, G. Del Bino et al. // *Cytometry.* – 1992. – Vol. 13, № 8. – P. 795–808.
6. Griffin C., Hamm C., McNulty J., Pandey S. Pancratistatin induces apoptosis in clinical leukemia samples with minimal effect on non-cancerous peripheral blood mononuclear cells // *Cancer. Cell. Int.* – 2010. – Vol. 10. – PP.6. doi:10.1186/1475-2867-10-6.
7. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death / D. Hockenbery, G. Nucez, C. Millman et al. // *Nature.* – 1990. – Vol. 348 (6299). – P. 334–336.
8. Kerr J.F.R., Wyllie A.H., Currie A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics // *Br. J. Cancer.* – 1972. – Vol. 26 – P. 239–257.

#### Рецензенты:

Максимов А.Г., д.м.н., доцент, доцент кафедры факультетской терапии ФГБОУ ВПО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Министерства обороны РФ, г. Санкт-Петербург;

Богданов А.Н., д.м.н., профессор, профессор кафедры терапии и ревматологии им. Э.Э. Эйхвальда Санкт-Петербургской медицинской академии последипломного образования, г. Санкт-Петербург.

Работа поступила в редакцию 07.07.2011.