

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель
министра здравоохранения



В.В. Колбанов

31 декабря 2003 г.
Регистрационный № 154-1203

**МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ПОКАЗАТЕЛЕЙ ИНТЕНСИВНОСТИ
СПОНТАННОГО И ИНДУЦИРОВАННОГО
АПОПТОЗА ЛИМФОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ
СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКОЙ
ДЛЯ КОРРЕКЦИИ ПРОВОДИМОЙ
ГЛЮКОКОРТИКОИДНОЙ ТЕРАПИИ**

Инструкция по применению

Учреждения-разработчики: Белорусский государственный медицинский университет, НИИ гематологии и переливания крови

Авторы: д-р мед. наук, проф. Н.Ф. Сорока, д-р мед. наук, проф. А.И. Свирновский, канд. мед. наук Е.С. Каля, канд. мед. наук С.А. Дубень, И.Б. Тарас, Т.В. Авхукова, А.Л. Рекун

ВВЕДЕНИЕ

Апоптоз (запрограммированная клеточная гибель) — это непатологический процесс, приводящий через ряд последовательных событий на генетическом и эпигенетическом уровнях 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 патогенеза и прогрессии ряда заболеваний, в том числе и аутоиммунных.

В патогенезе системной красной волчанки (СКВ), как и других системных заболеваний соединительной ткани, ведущую роль играют аутоиммунные механизмы (отсутствие толерантности иммунокомпетентных клеток к аутоантигенам, появление аутореактивных лимфоцитов, продукция большого количества аутоантител, образование иммунных комплексов). Развитие аутоиммунной патологии сопряжено с нарушением апоптоза лимфоцитов, который является основным механизмом освобождения организма от чужеродных клеток, дефектного генетического материала, аутоагрессивных и активированных «отработанных» клеток иммунной системы.

Предполагают, что при СКВ может наблюдаться снижение интенсивности апоптоза, в частности Fas-опосредованного, что связано с усиленной выработкой активированными Т-лимфоцитами растворимой формы Fas-рецептора и конкурентным подавлением Fas-FasL-взаимодействия (одного из путей инициации программированной клеточной гибели). В результате происходит накопление клона аутореактивных лимфоцитов, что поддерживает аутоиммунный процесс.

Однако не исключено, что лимфоциты крови больных СКВ обладают повышенной склонностью к апоптозу *in vitro*. При этом апоптоз сопровождается возрастанием экскреции в межклеточное пространство низкомолекулярных фрагментов хроматина (деградированной ДНК и гистонов). Таким образом, апоптотические клетки «поставляют» ранее скрытые аутоантигены, способствуя порочному кругу аутоагрессии. Возможно, изменения интенсивности апоптоза

мононуклеаров у больных СКВ реализуются в пределах одной субпопуляции лимфоцитов. Вероятна взаимосвязь ряда метаболических процессов в лимфоцитах больных СКВ с их склонностью к апоптозу. Так лимфоциты крови здоровых лиц, подвергшиеся антигенной стимуляции, характеризуются как повышенной способностью к спонтанному апоптозу, так и к генерации активных форм кислорода. Активация процессов перекисного окисления и угнетение элементов антиоксидантной защиты может приводить к потере трансмембранного потенциала митохондрий, активации каспаз, ДНК-фрагментации и в конечном итоге к апоптотической гибели клетки.

Таким образом, способность клеток к апоптозу может быть связана с особенностями их морфофункционального состояния и клинической картины заболевания в целом. С другой стороны, определение чувствительности лимфоидных клеток к терапевтическим воздействиям *in vitro* является существенным компонентом индивидуализации терапии (выбор препаратов для лечения, оптимизация терапии без ее интенсификации, мониторинг в процессе терапии), даже если невозможным оказывается проведение всего комплекса исследований, необходимых для прогнозирования течения заболевания.

Апоптотическая гибель клетки сопровождается различной степени специфичности изменениями на молекулярном, органелльном и клеточном уровнях, для регистрации которых в настоящее время предложено много методов.

Протеолитический каскад апоптотических протеаз является эффекторным звеном реализации процесса запрограммированной клеточной гибели. Считается, что после активации каспазного каскада процесс апоптоза 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. Морфологические изменения, характерные для апоптотических клеток, обусловлены именно этим процессом.

Одним из таких морфологических признаков апоптоза является изменение ядерной морфологии, проявляющееся в конденсации и

фрагментации ядерного хроматина. 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).

Определение количества спонтанно апоптозирующих клеток проводится в условиях краткосрочного культивирования клеток вне организма. При внесении в среду культивирования исследуемых факторов, в качестве которых используются лекарственные препараты, оценивается индуцированный апоптоз. Проще всего это осуществляется с помощью наиболее доступного в клинических условиях метода флуоресцентной микроскопии клеток после окраски их акридиновым оранжевым.

Требования техники безопасности

Работа с кровью, цитостатическими препаратами и реагентами проводится в стерильных условиях (лабораторных боксах) с использованием средств индивидуальной защиты (халат, фартук, резиновые перчатки, защитные очки). Отработанные образцы крови, лабораторная посуда, перевязочный материал и другие предметы, контактирующие с кровью и цитостатическими препаратами, собираются в отдельные специальные промаркированные емкости для последующей дезинфекции и/или сжигания.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

1. Определение способности к спонтанному апоптозу лимфоцитов периферической крови больных с впервые выявленным достоверным диагнозом СКВ либо предположительным диагнозом (до проведения гормональной терапии) для оценки выраженности аутоиммунного процесса.

2. Выявление интенсивности спонтанного и индуцированного глюкокортикоидами (дексаметазоном) апоптоза лимфоцитов для

оценки тяжести волчаночного процесса при различных клинических вариантах СКВ.

3. Использование показателей апоптоза (спонтанного, индуцированного и интегративного показателя — относительного апоптотического индекса) в лимфоцитах для коррекции проводимой глюкокортикоидной терапии у больных СКВ.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Необходимое оборудование

1. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки (ГОСТ 1770-74; ИСО 1042-83, ИСО 4788-80).

2. Пипетки стеклянные на 1, 2, 5, 10 мл.

3. Автоматические дозаторы на 40, 200, 1000 мкл.

4. Наконечники для автоматических дозаторов (Sarstedt, США).

5. 24-луночные планшеты (Flow Lab, Великобритания).

6. Установка обеспыливания (ламинар для клеточных культур) УО-БГ, допускается бокс с ламинарным током воздуха.

7. Центрифуга ОПн-5.

8. Термостат ТС-80, допускается инкубатор с подачей CO₂.

9. Источник CO₂.

10. Источник для облучения клеток (при необходимости).

11. Центрифуга ОПн-3У 4.2.

12. Микроскоп «Люам И-2».

13. Предметные стекла.

14. Покровные стекла.

15. Пробирки Эппендорф 1,5 см³.

16. Набор ареометров общего пользования (Минприбор, СССР), допускается другой.

17. Холодильники, морозильник (-20° С).

18. Сушильно-стерилизационный шкаф ССШ-80.

19. Эксикатор стеклянный с краном, диаметр 190 мм.

20. Микроскоп световой (×200–400) для подсчета клеток в камере Горяева.

21. Камера Горяева.

22. Счетчик Адамса для подсчета клеток.

23. Пробки резиновые ПР 27, 24, 20, 19, 18, 16, 14,5 (ГОСТ 7852-76).

Реактивы

1. Фиколл-400 (Pharmacia, Швеция).
2. Верографин 76 или 60% (Spofa, Чехия).
3. Гепарин, стерильный раствор для инъекций, в 1 мл 5 тыс. ЕД (АО «Белмедпрепараты»).
4. Хлорид натрия, изотонический раствор 0,9% для инъекций.
5. Среда RPMI-1640 (Flow Lab, Великобритания).
6. Эмбриональная телячья сыворотка (Sigma, США), допускается использование сыворотки крови эмбриональной (КРС, Минздрав РБ, ГУ НИИЭМ).
7. L-глутамин (Sigma, США).
8. Пенициллин.
9. Стрептомицин.
10. Параформальдегид (Sigma, США).
11. Фосфатный буферный раствор Дюльбекко (Sigma, США).
12. Акридиновый оранжевый (Sigma, США).
13. Лекарственные препараты.

Приготовление реактивов

1. Рабочий раствор верографина: 72,34 мл 76% верографина растворить в 79,34 мл бидистиллированной воды или 72,34 мл 60% верографина растворить в 47,66 мл бидистиллированной воды.
2. Рабочий 9% раствор фиколла: 22,5 г фиколла растворить в 227,5 мл подогретой бидистиллированной воды. Плотность раствора — 1,025.
3. Рабочий раствор фиколла-верографина: 7 частей верографина и 16 частей фиколла (105 и 240 мл). Плотность — 1,077. Смесь разлить в стерильные бутылки, закрыть стерильными пробками и хранить в морозильнике. Перед использованием разморозить нужное количество.
4. Раствор для стабилизации крови: 125 мкл раствора гепарина 5 тыс. ЕД/мл + 2,375 мл раствора среды RPMI-1640.
5. Основной раствор антибиотиков: пенициллин 100 тыс. ЕД/мл + стрептомицин 100 мг/мл.
6. Растворы лекарственных препаратов в концентрациях, соответствующих терапевтическим.

7. Полная питательная среда: среда RPMI-1640, содержащая 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 1% L-глутамина, 0,1% смеси антибиотиков.

8. Раствор параформальдегида 2% в фосфатном буферном растворе.

9. Фосфатный буферный раствор Дюльбекко: 9,6 г буфера + 1000 мл дистиллированной воды.

10. Раствор акридинового оранжевого 2 мг/мл.

ТЕХНОЛОГИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Выделение клеток

В стерильные флаконы для взятия крови внести 1 мл раствора гепарина в среде и 9 мл венозной крови, перемешать. Кровь развести физиологическим раствором в соотношении 2:1. Разведенную кровь медленно наложить в пробирке на фиколл-верографин (2 мл фиколл-верографина и 8 мл крови). Центрифугировать в течение 30 мин при 1500 об./мин. Лимфоциты образуют белое кольцо на поверхности фиколл-верографина. Пипеткой с тонким концом собрать кольцо лимфоцитов и перенести в отдельную пробирку. Отмыть лимфоциты путем добавления физиологического раствора и центрифугирования при 1200 об./мин в течение 15 мин. Супернатант слить, осадок ресуспендировать при добавлении физиологического раствора. Центрифугировать в течение 10 мин при 1200 об./мин. Осадок использовать как источник клеток.

Культивирование клеток

Клетки после выделения и отмывания физиологическим раствором хлорида натрия, как описано выше, поместить в среду для культивирования RPMI-1640, содержащую 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 1% глутамина, 0,1% смеси пенициллина и стрептомицина. Концентрация клеток в среде — 1–1,2 млн/мл. С помощью мерной пипетки перенести по 1 мл клеточной взвеси в 24-луночный планшет. Исследуемые препараты внести в виде раствора в концентрациях, предусмотренных схемой исследования (для каждой концентрации используют три лунки). В три лунки внести растворитель. Планшет поместить в эксикатор с увлажненной атмосферой и 5% CO₂ (в эксикатор через кран ввести 250 см³ CO₂),

инкубировать при 37° С в термостате. Через 24 ч (в зависимости от задачи можно через 48 или 72 ч) планшет извлечь из термостата, из каждой лунки отобрать пипеткой по 400 мкл клеточной взвеси, перенести в пробирки Эппендорф и добавить в каждую такой же объем 2% параформальдегида в фосфатном буферном растворе. Инкубировать в течение 30 мин при +4° С.

Приготовление препаратов для флуоресцентной микроскопии

Пробирки с фиксированной клеточной взвесью центрифугировать при 1500 об./мин в течение 5 мин. Супернатант удалить пипеткой. Осадок суспендировать в 200 мкл фосфатного буферного раствора, содержащего 0,1% Тритон X-100 и 30 мкг/мл акридинового оранжевого. Инкубировать в течение 30 мин при +4° С. Центрифугировать в течение 5 мин при 1500 об./мин. Супернатант отобрать пипеткой. Осадок ресуспендировать в 30–50 мкл фосфатного буферного раствора. Центрифугировать в течение 5 мин при 1500 об./мин. Нанести на обезжиренное предметное стекло 7–9 мкл окрашенной клеточной взвеси и накрыть покровным стеклом.

Учет результатов при микроскопии

Препараты анализировать с помощью микроскопа «Люам И-2» при увеличении $\times 100$ (окуляр 10 \times). Клеточные ядра окрашены в зеленый цвет. Хроматин живой клетки имеет рыхлую, неоднородную структуру. Окраска не очень яркая. Конденсированный хроматин выглядит в виде ярких, плотных, однородно окрашенных сфер или полумесяцев. Фрагментированный хроматин представлен однородно окрашенными горошинами, расположенными по оболочке ядра. Оценить 500 клеток (5 \times 100) и рассчитать среднее процентное содержание апоптотических клеток.

Трактовка результатов

Спонтанный апоптоз в лимфоцитах больных оценивается следующим образом:

- низкий — при наличии <7% апоптотических клеток;
- умеренный — при наличии 7–14% апоптотических клеток;
- высокий — при наличии 14,1–21% апоптотических клеток;
- очень высокий — при количестве апоптотических клеток > 21%.

Расчет относительного апоптотического индекса

Для более объективной оценки степени индукции апоптоза следует рассчитать относительный апоптотический индекс (Y) по формуле:

$$Y = [(X_{\text{индуц.}} - X_{\text{спонт.}})/X_{\text{спонт.}}] \times 100\%,$$

где $X_{\text{индуц.}}$ — процент апоптотических клеток (абсолютный апоптотический индекс) для индуцированного апоптоза, а $X_{\text{спонт.}}$ — аналогичный показатель для спонтанного апоптоза.

Этот индекс позволяет учитывать способность к индукции апоптоза с учетом величины спонтанного апоптоза, которая варьируется у разных больных.

ВОЗМОЖНЫЕ ТРУДНОСТИ ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ МЕТОДА

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. Недостатком этого метода является большие затраты времени при выполнении морфологической составляющей анализа, однако анализ может быть прерван на стадии фиксации клеток параформальдегидом и возобновлен в последующем.

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. Результаты, полученные с помощью этого метода, хорошо коррелируют с другими методами учета апоптотических клеток, тем более, что флуоресцентная микроскопия может использоваться для верификации других методик учета апоптотических клеток.

Противопоказания к применению: отсутствуют.