

*В.Н.Залесский, к.м.н., Н.В.Великая, к.м.н.*

## МЕТОДЫ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ АПОПТОЗА IN VITRO И IN VIVO ДЛЯ ОЦЕНКИ ХРОНИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ ТОКСИКАНТОВ

*Институт кардиологии им. Н.Д.Стражеско АМН Украины, Киев  
Национальный медицинский университет им. А.А.Богомольца,  
Киев*

В мировых классификаторах насчитывается более 6000 нозологических форм заболеваний человека, причём многие из них обусловлены экологическими факторами [1], а естественные системы гомеостаза при этом часто не обеспечивают надёжную защиту организма от антропогенной "токсической агрессии". В результате сложилась "токсическая ситуация", когда накопление промышленных отходов (в т.ч. в продуктах питания) приобретает лавинообразный характер: к исходу XX века в биосфере циркулировало около 4 млн. токсических веществ; 100 тыс. ксенобиотиков попадает в организм человека; около 50% генофонда жителей Европы не воспроизводится в последующих поколениях [2]. В итоге появляются новые, доселе неизвестные формы заболеваний — так называемые экологические, приводящие в ряде регионов к нарастанию явлений депопуляции [1]. Острота проблемы усугубляется влиянием растущего потребления алкоголя, наркотиков, курения, аллергизации, широкого и слабоконтролируемого приёма лекарственных препаратов и др. [3]. Наряду с этим, человека постоянно сопровождает "эндотоксиновая агрессия" как универсальный фактор патогенеза многочисленных заболеваний и состояний (атеросклероз, диссеминированное внутрисосудистое свёртывание — ДВС-синдром, эндотоксиновый шок различного генеза и другие) [4]. Оказалось, что многие экзо- и эндотоксиканты являются апоптогенами. В последние годы получены новые подтверждения ранее изученного участия апоптоза, [5,6] если не в инициации, то, по-меньшей мере, в прогрессировании острого инфаркта миокарда, мозгового инсульта, ней-

родегенеративных и др. заболеваний. Получены данные, свидетельствующие об участии апоптоза в патогенезе самых разнообразных болезней, скрывающихся под термином "лихорадок неясного генеза", хронических гепатитов и циррозов печени [10,11]. Это позволило классифицировать апоптоз как универсальный общепатологический процесс раннего развития многочисленных заболеваний и синдромов предболезни, для которой характерен весь комплекс проремального периода развития заболевания.

В практике доклинических токсикологических исследований безопасности химических и биологических веществ перспективу открывает широкое применяются экспресс-методы на цитотоксичность, в т.ч. тесты на повреждение ДНК. Одной из причин развития апоптотически-зависимой патологии химической этиологии являются возможные влияния токсикантов на структуру и функцию биологических мембран клетки. При этом методы оценки мембранотоксического действия химических соединений определяют селективность их эффектов. Известно, что метаболический фон любой клетки и возможности её самодеструкции (апоптоз) зависят от характера сигналов, поступающих из внеклеточного окружения. Несмотря на большое разнообразие индукторов апоптоза, особенности его различных путей внутриклеточной сигнализации и изменений во внутриклеточных мишенях способствуют развитию деструктивных процессов в клетке и завершаются разрушением геномной ДНК с последующим клеточным фагоцитозом. Кроме того, отмечена быстротечность процесса самоликвидации клеток, для завер-

шения которого часто достаточно несколько минут или часов [12]. При этом "ранняя" гибель отдельных клеток в популяции позволила характеризовать апоптоз как "тихую" смерть [13]. Всё вышеизложенное обосновывает необходимость не только подробного рассмотрения методов визуализации апоптоза in vitro и in vivo, но и анализа подходов, позволяющих изучать ранние динамические процессы апоптоза альтернативными (находящимися за рамками экспериментов на теплокровных животных) методами. В обзоре также представлены данные регистрации апоптоза как динамического процесса с помощью получившей развитие в последнее время техники прижизненной неинвазивной визуализации тканей и органов.

### Визуализация морфологических изменений в апоптотически измененных клетках

Роль индукторов и блокаторов апоптоза подтверждена преимущественно патогистологическими методами с использованием биопсий и аутопсий. Описано большое количество методов выявления апоптотических клеток, которые основаны на разных принципах и преследуют различные цели. Методы количественного определения апоптотических клеток базируются на качественной и/или количественной оценке событий, вызванных изменениями в плазматической мембране клеток; избирательной фрагментации ядерной ДНК; изменениями структуры клеточных компонентов или их перераспределением; снижением pH в цитоплазме. Следует отметить, что отличительные морфологические или биохимические особенности апоптотических клеток могут в значительной степени зависеть от типа клеток, природы индуктора и стадии апоптоза.

Наиболее доступным и простым методом выявления апоптотических клеток и изучения их морфологических особенностей служит световая микроскопия гистологических препаратов. Для этого используют тонкослойные срезы, окрашенные азуром А (для идентификации формы хроматина) или гематоксилином и эозином (для выявления структур цитоплазмы). Результаты микроскопических исследований свидетельствуют о конденсации цитоплазмы и ядерного материала в клетках после индукции апоптоза in vitro. Труднос-

ти с выявлением апоптических клеток *in vivo* обусловлены, главным образом, их быстрым разрушением и перевариванием клетками окружения. Для количественной оценки содержания апоптических клеток преимущественно используют апоптический индекс (АИ), который рассчитывают по формуле [14]:

$$AI = \frac{\text{количество апоптических клеток}}{\text{общее количество}} \times 100.$$

Особенно удобным для этой цели считается метод флуоресцентной микроскопии с использованием красителя Хехст 33342, связывающегося с ДНК. Метод оказался эффективным при исследовании свежих аспиратов, взятых с помощью тонкой иглы [15].

Важно отметить, что в случае микроскопии культур клеток во избежание ошибочного определения АИ необходимо отделить клетки от подложки, и проводить подсчет только после их объединения с клетками, находящимися в среде культивирования. Вследствие изменений проницаемости плазматической мембраны апоптические клетки накапливают краситель Хехст 33342 значительно быстрее, чем интактные [16]. Метод позволяет выявлять ранние изменения проницаемости плазматической мембраны и хроматина, предшествующие межнуклеосомной фрагментации ДНК.

Характерные для апоптических клеток ультраструктурные изменения можно выявить с помощью электронной микроскопии [17]. Этот метод, являющийся сегодня "золотым стандартом", позволяет проводить качественный анализ изменений, происходящих в отдельных клетках во время их апоптической гибели. С помощью метода электронной микроскопии выявляют различия в ультраструктурных изменениях клеток в динамике апоптоза, инициированного действия различных индукторов апоптоза. Однако, сложность методики изготовления образцов и продолжительность времени, затрачиваемого на проведение анализа, существенно ограничивают возможности использования этого метода визуализации.

#### **Биохимический контроль апоптических изменений Клеточная мембрана**

Известно, что мембрана клетки имеет асимметричное строение. Одним из ранних "маркеров" апоптических

изменений эукариотических клеток служит утрата асимметрии плазматической мембраны, вызванная перемещением на ее внешнюю сторону мембранного фосфолипида — фосфатидилсерина [18]. Установлено, что такое изменение можно выявлять с помощью белка аннексина  $\nu$ , который связывается с фосфатидилсеринном с высокой степенью сродства [18]. Предложено использовать конъюгат аннексина  $\nu$  в сочетании с пропидий иодидом или флуоресцеином изотиоцианатом при проведении проточной цитофлуориметрии (ПЦ). Такой анализ не требует длительной инкубации клеток с красителем и дополнительных этапов отмывания клеток от несвязавшегося красителя, когда неизбежна утрата клеток. Однако, потребность в относительно большом количестве клеток, необходимом для проведения анализа ( $10^6$  клеток на пробу), существенно ограничивают возможности метода.

#### **Митохондрии**

Изменения в митохондриях являются одним из наиболее ранних событий, происходящих в клетках во время апоптоза [19]. Одним из способов регистрации таких изменений служит определение митохондриального трансмембранного потенциала ( $\Delta\psi_m$ ) методом ПЦ с применением различных липофильных флуорохромов, например, хлорметил- $x$ -родамина и метилового эфира тетраметилродамана [20]. Авторы полагают, что такие липофильные флуорохромы можно успешно использовать для выявления клеток, находящихся на разных этапах апоптоза [21]. Модификация метода ПЦ [20] позволяет одновременно определять значение ( $\Delta\psi_m$ ) и уровень экспрессии мембранных структур или внутриклеточных антигенов. Такая модификация основана на использовании трех красителей, один из которых (хлорметил- $x$ -родамин) связывается с митохондриальной мембраной, тогда как с помощью антител, меченных флуоресцеином изотиоцианатом и фикоэритрином, удастся выявить апоптоз-специфические антигены (например, белок Bcl-2).

Высвобождение цитохрома С из митохондрий в цитозоль является важным этапом апоптоза, приводящим к активации каспазного каскада. Для определения содержания цитохрома С в цитозоле апоптических клеток используют методы спектро-

фотометрии [21] и иммуноблоттинга [22]. Последний позволяет с помощью специфических антител выявить среди белков цитозоля субстанцию, электрофоретическая подвижность которой соответствует молекулярной массе цитохрома С.

#### **Цитоплазматические белки**

Каспазы цитозоля являются главными медиаторами апоптоза [12], а их активация происходит на ранних этапах апоптической гибели. Поэтому определение энзиматической активности каспаз может служить важным показателем инициации апоптоза. Один из широко применяемых методов регистрации каспазной активности — флуориметрический анализ основан на взаимодействии клеток лизатов с их специфическим субстратом, конъюгированным с флуорохромом AFC (7-амино-4-трифлуорометилкумарин) [23]. Например, с помощью этого метода удастся выявить активность каспазы 3 при рецептор-опосредованном апоптозе. Альтернативным методом определения активности каспаз является иммуногистохимический анализ, позволяющий выявить *in vivo* продукты расщепления их специфических субстратов [12,24]. Авторы получили антипептидные антитела, специфически связывающиеся с двумя фрагментами энзима поли(АДФ-рибозо) полимеразы, которые образуются после его расщепления каспазой 3.

Другими ранними событиями, характерными для апоптических клеток, являются изменения их ионного гомеостаза и величины внутриклеточного рН [25]. Повышение концентрации свободных ионов  $Ca^{2+}$  в цитозоле клеток, выявляемое с помощью ПЦ и специальных флуоресцентных красителей (зондов), служит чувствительным показателем их последующего апоптоза.

#### **Ядро**

Одним из характерных биохимических признаков апоптоза является расщепление эндонуклеазами двуспиральной ядерной ДНК. Сегодня известны не менее трех типов фрагментации ДНК во время апоптоза: 1) одностранные разрывы ДНК; 2) фрагментация ДНК на большие участки (50-300 тыс. пар оснований); 3) межнуклеосомное расщепление ДНК на фрагменты, длина которых кратна 180-200 парам оснований. Гель-электрофорез единичных клеток (ме-

тод ДНК — комет) является высокочувствительным методом выявления одонитивных разрывов ДНК [26]. Метод основан на анализе электрофоретической подвижности ДНК единичных клеток, помещенных в агарозный гель. Поскольку с помощью обычного электрофореза ДНК в агарозном геле не удается разделить фрагменты ДНК большого размера, то для этого был разработан специальный метод пульс-электрофореза ДНК [27]. A. Facchinetti и соавт. [28] предложили определять фрагментацию ДНК с помощью оригинального метода, базирующегося на применении саузерн-гибридизации ДНК. В этом случае после электрофоретического разделения препаратов ДНК осуществляют их перенос на нитроцеллюлезную или нейлоновую мембрану, где гибридируют с пробрами радиоактивно меченной тотальной ДНК. Авторы этого метода считают, что его чувствительность примерно в 3 раза выше, чем при окрашивании ДНК бромистым этидием, и поэтому с его помощью удастся выявить очень малые количества фрагментированной ДНК. Одним из недостатков метода является невозможность проведения одновременного анализа большого количества проб.

Лазерная сканирующая цитометрия (ЛСЦ), разработанная L.A. Kamensky L.D. Kamensky (цит. по [29]), является вариантом цитометрии, который сочетает возможности методов проточной и "имидж"-цитометрии. Этот метод позволяет регистрировать максимальный уровень флуоресценции, наблюдаемой во время конденсации хроматина в отделном клеточном ядре.

Как уже отмечалось, во время апоптоза под действием эндонуклеаз происходят многочисленные разрывы нитей ДНК, в результате чего образуется множество ее 3'-концов. Их присутствие в клетках можно детектировать с помощью модифицированных нуклеотидов (например, биотин-d UTP) в реакции НИК-мечения, катализируемой ДНК-полимеразой или терминальной дезоксирибонуклеотид-трансферазой — метод "НИК-мечения 3'-концов молекулы ДНК" [30].

"Ранние" апоптотические клетки с фрагментацией ДНК, у которых еще отсутствуют или слабо выражены морфологические изменения, характерные для апоптоза, выявляются методом TUNEL [17]. Одна из последних модификаций TUNEL-метода позволяет выявлять фрагмента-

цию ДНК в образце, содержащем всего 5 нг ДНК, причем чувствительность такой детекции более чем в 200 раз превышает таковую при рутинном способе окраски ДНК [31].

Выход моно- и олигонуклеосомных фрагментов ДНК из ядра в цитоплазму апоптотических клеток можно регистрировать методом ELISA с использованием моноклональных антител, специфических для нуклеосомных эпителиев. Количество нуклеосомных фрагментов ДНК, содержащихся в лизате апоптотических клеток, определяют калориметрически с помощью антител против гистонов и ДНК. По данным [32], чувствительность такого анализа более чем в 500 раз выше выявления фрагментации ДНК методом гель-электрофореза. К существенным преимуществам метода следует отнести возможность одновременного анализа большого количества образцов; к основным недостаткам то, что пробы должны быть проанализированы немедленно, так как их хранение может привести к значительному ослаблению реакции.

Методы прижизненной неинвазивной визуализации апоптоза в экспериментальных и клинических условиях остаются сложными для разрешения вопросы выявления процессов дестабилизации (торможения или стимуляции) апоптоза, которые имеют место при тех или иных патологических состояниях [5-7]. Роль апоптоза в патогенезе заболеваний человека [5,11] подтверждена преимущественно патогистологическими методами с использованием биопсии и аутопсии. Однако такие исследования не позволяют получить ясное представление о динамике патологического процесса. Первые попытки успешной регистрации апоптоза как динамического процесса сделаны с помощью получившей развитие в последнее время техники прижизненной неинвазивной визуализации тканей и органов. Имеется 5 универсальных клинических методов визуального контроля апоптоза — однофотонная эмиссионная компьютерная томография (ОФЭКТ), позитронная эмиссионная томография (ПЭТ), магнитно-резонансная томография (МРТ), магнитно-резонансная спектроскопия (МРС) и ультразвуковая доплероскопия (УДС).

ОФЭКТ позволяет получать трехмерное изображение распределения  $\gamma$ -излучающих стабильных изотопов ( $^{131}\text{Xe}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ). Этот ме-

тод применяется в основном для исследования регионального мозгового и коронарного кровотока. Однако в последние годы его используют и для прижизненной визуализации апоптоза. Выявление апоптоза методом ОФЭКТ основано на том, что на ранних этапах его развития молекулы анионного лиганда фосфатидилсерина перемещаются из внутренней на внешнюю сторону клеточной мембраны, что связывают с инактивацией ферментов (транслоказа, флоппаза) и соответствующей активацией фермента скрамблаза (цит. по [36]). Молекулы фосфатидилсерина, экспрессирующиеся на поверхности апоптотических (но не интактных) клеток, можно визуализировать *in vivo* с помощью зонда, содержащего белок аннексин V. У человека аннексин V имеет молекулярную массу 36 кДа и с высокой аффинностью связывается с фосфатидилсерином плазматической мембраны [33, 34]. В 1998 г. впервые была разработана методика получения аннексиновых зондов, меченных  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  [35]. В экспериментах *in vivo* было показано, что локализация меченного аннексина V после его внутривенного введения соответствует переходу фосфатидилсерина на внешнюю сторону клеточной поверхности [36]. Эффективность использования  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -аннексина V для визуализации апоптоза подтверждена в предклинических исследованиях на моделях Fas-опосредованного апоптоза гепатоцитов, реакции отторжения трансплантатов сердца, а также физиологической гибели лейкоцитов [38].

ПЭТ-методом получают изображения анатомических структур путем внутривенного или ингаляционного введения излучающих позитроны меченных изотопов (в том числе кислорода, углерода, азота, фтора, гелия). На модели гепатомы Мориса у крыс показано, что индукция апоптоза опухолевых клеток цитостатиком гемцитабином сопровождается увеличением поступления в них флюоро-2-деоксиглюкозы, меченной  $^{18}\text{F}$  [27]. Области применения метода ПЭТ для визуализации апоптоза включает дифференциальную диагностику рецидива опухоли и лучевого некроза; оценку степени малигнизации опухоли; раннюю диагностику заболеваний церебральных и коронарных сосудов, нейродегенеративных процессов, а также в сочетании с ОФЭКТ для визуализации апоптоза,

индуцированного химиопрепаратами в различных органах и тканях.

МРТ-метод основан на получении изображения за счет тканевых изменений в поведении протонов при воздействии сильного магнитного поля. Благодаря эффекту ядерно-магнитного резонанса (избирательного поглощения электромагнитного излучения различными тканями) протоны переориентируются по направлению магнитного поля и излучают сигнал, который преобразуют в изображение. Получаемое в режимах  $T_1$  и  $T_2$  изображение основано на спин-релаксационных частотах тканей. Один из подходов МРТ, разработанный для визуализации апоптоза, связан с использованием белка синаптотагмина-1, который специфически распознает молекулы фосфатидилсерина на наружной мембране апоптической клетки [38]. С этой целью С2-участок синаптотагмина-1 конъюгируют с суперпарамагнитными частицами оксида железа. Вводимый внутривенно конъюгат позволяет выявить апоптические клетки на начальных стадиях гибели, когда в них еще отсутствуют морфологические изменения. После введения конъюгата синаптотагмина-1 на  $T_2$ -взвешенных изображениях отмечается повышенная интенсивность сигнала в участках тканей, содержащих высокий уровень апоптических клеток. Следует отметить, что используемый в качестве контрастного агента конъюгат синаптотагмина-1 не проявляет токсичности, и при анализе апоптических клеток по степени их контрастирования не уступает методу компьютерной рентгеновской томографии.

МР-спектроскопия основана на эффекте ядерно-магнитного резонанса и позволяет оценить химический состав и динамику метаболитических

изменений в исследуемой ткани. Протонная ( $^1H$ ) МР-спектроскопия [39] позволяет регистрировать в клетках небольшие липидные образования (так называемые липидные тельца), которые в динамике развития апоптоза формируются в цитоплазме вследствие изменений липидного состава и текучести клеточной мембраны. Помимо МР-спектроскопии на ядрах  $^1H$ , существуют и другие варианты метода, связанные с использованием для визуализации клеток в состоянии апоптоза стабильных изотопов ( $^{13}C$ ,  $^{19}F$ ,  $^{31}P$ ) [39-42].

С помощью математического анализа спектров  $^{13}C$  и  $^{31}P$  в клетках, погибающих путем апоптоза, выявлено достоверное увеличение уровня фруктозо-6-бисфосфата,  $Ca^{2+}$ , жирных кислот, фосфолипидов. Полученные результаты свидетельствуют о высокой чувствительности этого метода для обнаружения метаболитических отклонений в апоптической клетке. Преимуществом  $^1H$  МР-спектроскопии является возможность серийного мониторинга липидов тканей без необходимости применения контрастного агента. К недостаткам МР-спектроскопии можно отнести постоянный расход достаточно дорогих хладагентов (жидких  $He$  и  $N_2$ ).

УЗС — метод основан на анализе радиочастотных характеристик отраженных сигналов ультразвука, поступающих от ограниченной популяции клеток, находящихся на начальных стадиях гибели с помощью компьютерного калибрования спектров рассеивания и усреднения отраженных ультразвуковых сигналов [43]. При этом два широкополосных ультразвуковых датчика, излучающих на частотах 30 и 34 МГц, совмещены с системой регистрации и автоматического анализа отраженных сигналов, позволяют получать графическое изображе-

ние ультразвуковых сигналов. Оказалось, что для апоптических клеток характерно двукратное увеличение интенсивности рассеивания отраженных ультразвуковых сигналов по сравнению с интактными клетками. Полученная высокая степень усреднения ультразвуковых сигналов во времени позволила выявить отчетливый пик (соответствующий 14 дБ), появление которого обусловлено повреждением ДНК в ядрах апоптических клеток [44]. В дальнейшем было показано, что появление отраженных микросигналов ("microechoes") ультразвука обусловлено конденсацией хроматина ядра и апоптической гибелью клеток [45]. К преимуществам метода следует отнести быстроту проведения анализа, безболезненность и возможность многократного применения у одного и того же больного при отсутствии лучевой нагрузки.

Таким образом, в последнее время разработан целый ряд технологий визуализации апоптоза *in vivo* и *in vitro*. Рассмотрены не только методы определения морфологических и биохимических изменений апоптических клеток в популяции и их количественной оценки, но и проанализированы подходы, позволяющие изучить динамику процесса апоптоза в отдельных клетках. С помощью томографических, спектроскопических и ультразвуковых методов показана возможность неинвазивно и безвредно получать в масштабе реального времени объективную информацию о степени выраженности апоптоза в отдельных тканях и органах. Это увеличивает арсенал методов оценки мембранопатологических эффектов токсикантов (в т.ч. пищевых), а также позволяет оптимизировать программу доклинических токсикологических исследований безопасности лекарственных соединений.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Агаджанян Н. А., Полунин И. Н. Экологическая безопасность и здоровье. — М.: АМИ, 2000. — 145с.
2. Suess M.J., Huismaus J.W. (Eds.) Management of Hazardous Waste. — Copenhagen.: WHO Regional Publication. European Series, №14, 1993. — 98p.
3. Доклад о состоянии здравоохранения в Европе 2002г. Региональные публикации ВОЗ, Европейский цикл, №97. — Копенгаген: региональное бюро ВОЗ, 2002. — 156с.
4. Yakovlev M. Y. Elements of endotoxin theory of human physiology and pathology: "systemic endotoxemia", "endotoxin aggression" and "endotoxin insufficiency" // J.Endotoxin Research. — 2000. — V6, N2. — P.217-226.
5. Залесский В.Н., Гавриленко Т.И. Апоптоз при ишемии и реперфузии миокарда // Врач. дело. — 2002. — №1. — С. 8-15.
6. Залесский В.Н., Фильченков А.А. Перспективы патофизиологически обоснованного применения модуляторов апоптоза в качестве нейро-, кардио-, гепато- и нефроцитопротекторов. // Совр. пробл. токсикол. — 2002. — №4. — С. 64-70.
7. Фильченков А.А., Залесский В.Н. Апоптоз кортикальных нейронов при развитии ишемических инсультов. // Нейрофизиология. — 2002. — Т.34, №6. — С.468-484.
8. Стойка Р.С., Фильченков А.А., Залесский В.Н. Трансформирующий фактор роста в патогенезе атеросклероза. // Укр. кардиологический журнал. — 2003. — №1. — С. 122-127.
9. Залесский В.Н., Великая Н.В., Механизмы цитотоксических эффектов активных молекул кислорода и развития апоптоза. // Совр. проблемы токсикологии. — 2003. — №1. — С. 11-17.
10. Залесский В.Н., Великая Н.В. Механизмы апоптоза при заболеваниях печени. // Совр. проблемы токсикологии.

- логии. — 2002. — №4. — С. 27-32
11. *Shulte H.R., Bursch W., Grasl K.B.* Active cell death (apoptosis) in liver biology and disease. In: Boyer J.L., Ockuer R.K. (Eds) Progress in Liver Diseases, vol 13. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1995. — P.1-35.
  12. *Stenniche H.R., Salvesen G.S.* Properties of caspases // *Biochim. Biophys Acta.* — 1998. — V.1387. — P.17-31.
  13. *Фильченков А.А., Стойка Р.С.* Апоптоз и рак. — К.: МОРИОН, 1999. — С. 190.
  14. *Longsdon M.D., Meyn R.E., Besa P.S. et al.* Apoptosis and Bcl-2 gene family patterns of expression and prognostic value in stage I and II follicular center lymphoma // *Int.J.Radiat.Oncol. Biol. Phys.* — 1999. — 44, №2. — P.19-29.
  15. *Maciorowski Z., Dclie V., Padoy E, et al.* Comparative analysis of apoptosis measured by Hoechst and flow cytometry in non'Hodgkin's lymphomas. // *Cytometry.* — 1998. — 32, №6. — P.44-50.
  16. *Collins J.A., Schandi C.A., Yang K.K. et al.* Mayor DNA fragmentation is a late event in Apoptosis // *Histochem. Cytochem.* — 1997. — 45, №7. — P.923-934.
  17. *Sanders E.J., Wride M.A.* Ultra-structural identification of apoptotic nuclei using the TUNEL technique // *Histochem J.* — 1996. — 28, №4. — P.275-281.
  18. *Fadok V.A., Voelker D.R., Champbel P.A. et al.* Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggered specific recognition and removal by macrophages // *J.Immunol.* — 1992. — 48, №15. — P.2207-2216.
  19. *Metivier D., Dalaporta B., Zamzami N. et al.* Cytofluorometric detection of mitochondrial alterations in early CD 95 / Fas/ Apo 1-triggered apoptosis // *Immunol. Lett.* — 1998. — 61, №9. — P.157-163.
  20. *Macho A., Decandin D., Castedo M. et al* Chloromethyl-X-Rodamine is an aldehyde-fixable potential-sensitive fluorochrome for the detection of early apoptosis // *Cytometry.* — 1996. — 25, №6. — P.335-340.
  21. *Perez-Pinzon M.A., Xu G.P., Born J. et al.* Cytochrome C is released from mitochondria into the cytosol after cerebral anoxia or ischemia // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* — 1999. — 19, №1. — P.39-43.
  22. *Fujimura M., Morita F.Y., Murakami K. et al.* Cytosolic redistribution of cytochrome C after transient focal cerebral ischemia in rats // *J.Cereb. Blood Flow Metab.* — 1998. — 18, №9. — P.1239-1247.
  23. *Gurtu V., Kain S.R., Zhang G.* Fluorometric and colorimetric detection of caspase activity associated with apoptosis // *Ann.Biochem.* — 1997. — 251, №4. — P.98-102.
  24. *Sallmann F.R., Bonrassa S., Saint-Cyz J.* Characterization of antibodies specific for the caspase cleavage site on poly (ADP-ribose) polymerase: specific detection of apoptotic fragment // *Biochem.Cell Biol.* — 1997. — 75, №3. — P.451-456.
  25. *Eastman A.* Assays for DNA fragmentation endonucleases and intracellular pH and Ca<sup>2+</sup> associated with apoptosis // *Methods Cell Biol.* — 1995. — 46, №12. — P.41-45.
  26. *Тронов В.А., Терещенко Д.Г., Конопляников М.А.* Механизм радиационной гибели лимфоцитов периферической крови человека, оцениваемой методом ДНК-комет. // *Биофизика.* — 1998. — Т. 43, № 6. — С. 115-124.
  27. *Allen P.D., Newland A.C.* Electrophoretic DNA analysis for the detection of apoptosis // *Mol. Biotechnol.* — 1988. — 9, №8. — P.247-251.
  28. *Facchinotti A., Tassarolo L., Mazzocchi M. et al.* An improved method for the detection of DNA fragmentation // *J.Immunol.Methods.* — 1991. — 136, №7. — P.125-131.
  29. *Furuya T., Kamada T., Murakami T. et al* Laser scanning cytometry allows detection of cell death with morphological features of apoptosis cells stained with PI. // *Cytometry.* — 1997. — 29, №3. — P.173-177.
  30. *Govrieli Y., Shermann Y., Ben-Sussan S.A.* Identification of apoptosis in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation // *J.Cell Biol.* — 1992. — 119, №8. — P.493-501.
  31. *Peng L., Lin J.J.* A novel method for quantitative analysis of apoptosis. // *Lab.Invest.* — 1997. — 77, №7. — P.547-555.
  32. *Salgame P., Varadhachary A.S., Primiano L.L. et al.* An ELISA for detection of apoptosis. // *Nucl.Acids Res.* — 1997. — 25, №8. — P.680-691.
  33. *Narula J., Acio E.R., Narula N. et al.* Annexin V imaging for noninvasive detection of cardiac allograft rejection // *Nat.Med.* — 2001. — 7, №12. — P.1347-1352.
  34. *Blankenberg F.G., Katsikis P.D., Tain J.F. et al.* Imaging of apoptosis with <sup>99m</sup>Tc-annexin V // *J.Nucl.Med.* — 1999. — 40, №11. — P.184-191.
  35. *Blankenberg F.G., Katsikis P.O., Tain J.F. et al.* In vivo detection and imaging of phosphatidylserin expression during programmed cell death // *Proc.Natl. Acad. Sci. USA.* — 1998. — 95, №7. — P.6349-6354.
  36. *Green A.M., Steinmetz N.D.* Monitoring apoptosis in real time // *Cancer J.* — 2002. — 8, №6. — P.82-92.
  37. *Haberkom O., Bellemann M.E., Brix G. et al.* Apoptosis and changes in glucose transport early after treatment of Morris hepatoma with gencitabine. // *Eur.J.Nucl.Med.* — 2001. — 28, №6. — P.418-425.
  38. *Zhao M., Beaugerard D.A., Loizon L. Et al.* Non-invasive detection of apoptosis using magnetic resonance imaging and target contrast agent. // *Nat.Med.* — 2001. — 7, №12. — P.1241-1244.
  39. *Di Vito M., Lenti L., Kuijn A. Et al.* <sup>1</sup>H-NMR-visible mobile lipid domains correlate with cytoplasmic lipid bodies in apoptotic T-lymphoblastoid cells // *Biochem.Biophys Acta.* — 2001. — 153, №2. — P.47-66.
  40. *Henke J., Engelmann J., Kutscher B. Et al.* Changes of intracellular calcium fatty acids and phospholipids during miltefosine-induced apoptosis monitored by fluorescence- and I3C NMR-spectroscopy // *Anticancer Res.* — 1999. — 19, №11. — P.4027-4032.
  41. *Williams S.H., Anthony M.L., Brindle K.M.* Induction of apoptosis in two mammalian cell lines results in increased levels of fructose-1, 6-biphosphate and CDP-choline as determined by <sup>31</sup>P-MRS // *Magn.Res. Med.* — 1998. — 40, №8. — P.411-420.
  42. *Star-Lack J.M., Abalsteinsson E., Adam M.F.* 1-H MR spectroscopy of human head and neck lymph node metastasis and comparison with oxygen tension measurement // *Am.J.Neuororadiol.* — 2000. — 21, N5. — P.183-193.
  43. *Kolios M.C., Czarnota G.J., Lee M. et al.* Ultrasonic spectral parameter characterization of apoptosis // *Ultrasound Med.Biol.* — 2002. — 28, N12. — P.589-597.
  44. *Czarnota G.J., Kolios M.C., Abraham J. et al.* Ultrasound imaging of apoptosis: high-resolution non-invasive monitoring of programmed cell death in vitro, in situ and in vivo // *Br.J.Cancer.* — 1999. — 81, N3. — P.520-527.
  45. *Hunt J.M., Worthington A.E., Xian A. et al.* A model based upon pseudo regular spacing of cells combined with the randomization of the nuclei can explain the significant changes in high-frequency ultrasound signals during apoptosis. // *Ultrasound Med.Biol.* — 2002. — 28, N4. — P.217-226.

**В.Н. Залеський, Н.В. Велика**  
**МЕТОДИ РАНЬОЇ ДІАГНОСТИКИ АПОПТОЗУ**  
**IN VITRO І IN VIVO ДЛЯ ОЦІНКИ ХРОНІЧНИХ**  
**ЕФЕКТІВ ТОКСИКАНТІВ**

В огляді проаналізовано сучасний стан проблеми візуалізації апоптичних клітин. Охарактеризовані морфологічні, біохімічні технології виявлення апоптозу in vitro та in vivo. Розглянуто методи прижиттєвої візуалізації апоптозу у тканинах та органах: одnofотонна емісійна комп'ютерна томографія, позитронна емісійна томографія, магнітно-резонансна томографія, магнітно-резонансна спектроскопія і ультразвукова доплероскопія.

**V.N. Zalesky, N.V. Velikaja**  
**VISUALISATION APOPTOSIS METHODS IN VITRO**  
**AND IN VIVO FOR EVALUATING CHRONIC**  
**EFFECTS OF THE TOXICANTS**

This paper reviews the available literature on visualization of the apoptotic cells. The existing morphologic and biochemical technologies and non-invasive methods for assessing apoptosis in vivo such as, single photon emission computerized tomography, magnetic resonance imaging, magnetic resonance spectroscopy and ultrasound spectroscopy imaging are briefly characterized. The possible applications of these techniques in control of membranotoxic effects toxicants and drugs abuse are also discussed.