

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Гальцева И.В.¹, Филипенко М.Л.², Давыдова Ю.О.¹, Лучкин А.В.¹, Капранов Н.М.¹, Кондратьева Ю.А.¹, Субботин С.В.², Храпов Е.А.², Никифорова К.А.¹, Фидарова З.Т.¹, Гапонова Т.В.¹, Менделеева Л.П.¹, Михайлова Е.А.¹, Паровичникова Е.Н.¹, Савченко В.Г.¹

СОПОСТАВЛЕНИЕ МЕТОДОВ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ И ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ ДЛЯ ИЗМЕРЕНИЯ ДЛИНЫ ТЕЛОМЕР ЛЕЙКОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава РФ, 125167, Москва, Россия;
²ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН», 630090, Новосибирск, Россия

Определение длины теломер может проводиться методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), позволяя получить абсолютную длину теломер (АДТ), выраженную в количестве пар нуклеотидов, и с помощью проточной цитометрии, которая может оценить только относительный показатель длины теломер. Целью исследования было сопоставить результаты двух методов и разработать точный и надежный способ перевода относительной длины теломер в абсолютную. Материалом для исследования служила периферическая кровь от 21 донора. Измерение длины теломер лейкоцитов методом проточной цитометрии проводили с помощью коммерческого набора Telomere PNA Kit/FITC (Dako, Дания) на двух проточных цитометрах CytoFLEX (Beckman Coulter, KHP) и BD FACSCanto II (Becton Dickinson, США), получая молекулярный эквивалент флуоресценции (МЭФ). Для измерения длины теломер методом ПЦР в режиме реального времени получали калибраторы с известным числом теломерных повторов. Проводили две количественных ПЦР: одну – для теломерных повторов, другую – для определения количества геном-эквивалентов ДНК, трижды для каждого образца, что позволяло рассчитать АДТ. Обнаружена сильная прямая связь между МЭФ, полученными при анализе проб на BD FACSCanto II и CytoFLEX ($r = 0,97$). При корреляционном анализе результатов ПЦР и проточной цитометрии была обнаружена значимая взаимосвязь между АДТ и МЭФ. Мы рассчитали уравнения регрессии АДТ от МЭФ для CytoFLEX – $y = 0,0043x$ ($r = 0,84$) и для BD FACSCanto II – $y = 0,0051x$ ($r = 0,82$). Проведенный корреляционный анализ показал высокую сопоставимость результатов определения длины теломер двумя методами. Полученные уравнения регрессии позволяют перевести результаты проточной цитометрии в абсолютные показатели, позволяя сравнивать результаты разных исследовательских групп и применять этот метод в клинических исследованиях.

Ключевые слова: теломеры; проточная цитометрия; полимеразная цепная реакция в реальном времени; лейкоциты.

Для цитирования: Гальцева И.В., Филипенко М.Л., Давыдова Ю.О., Лучкин А.В., Капранов Н.М., Кондратьева Ю.А., Субботин С.В., Храпов Е.А., Никифорова К.А., Фидарова З.Т., Гапонова Т.В., Менделеева Л.П., Михайлова Е.А., Паровичникова Е.Н., Савченко В.Г. Сопоставление методов полимеразной цепной реакции и проточной цитометрии для измерения длины теломер лейкоцитов человека. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021;66 (3): 154-159. DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-3-154-159>

Galtseva I.V.¹, Filipenko M.L.², Davydova Yu.O.¹, Luchkin A.V.¹, Kapranov N.M.¹, Kondratieva Yu.A.¹, Subbotin S.V.², Khrapov E.A.², Nikiforova K.A.¹, Fidarova Z.T.¹, Gaponova T.V.¹, Mendeleeva L.P.¹, Mikhailova E.A.¹, Parovichnikova E.N.¹, Savchenko V.G.¹

COMPARISON OF POLYMERASE CHAIN REACTION AND FLOW CYTOMETRY FOR MEASURING TELOMERE LENGTH OF HUMAN LEUKOCYTES

¹National Research Center for hematology, 125167, Moscow, Russia;

²Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, 630090, Novosibirsk, Russia

Telomere length can be measured by polymerase chain reaction (PCR), allowing to obtain the absolute length of telomeres (ALT) in base pair, and by flow cytometry, which can only estimate the relative telomere length. The aim of the study was to compare the results of the two methods and to develop an accurate and reliable way of converting the relative telomere length to absolute. The peripheral blood from 21 donors was analyzed. Measurement of leukocyte telomere length by flow cytometry was carried out using a commercial Telomere PNA Kit / FITC (Dako, Denmark) with two CytoFLEX flow cytometers (Beckman Coulter, China) and BD FACSCanto II (Becton Dickinson, USA), obtaining the molecular equivalent of fluorescence (MEF). To measure telomere length by real-time PCR, calibrators with a known number of telomeric repeats were prepared. Two quantitative PCRs were carried out: one for telomeric repeats, the other for determining the number of genome-equivalents of DNA, three times for each sample, which made it possible to calculate ALT. A strong direct relationship was found between the MEF obtained with BD FACSCanto II and CytoFLEX ($r = 0.97$). Analysis of PCR and flow cytometry results showed a significant correlation between ALT and MEF. We calculated the regression equations of ALT and MEF for CytoFLEX – $y = 0.0043x$ ($r = 0.84$) and for BD FACSCanto II – $y = 0.0051x$ ($r = 0.82$). Correlation analysis showed a high comparability of telomere lengths measured by two methods. The obtained regression equations allow converting the results of flow cytometry into absolute values, allowing the comparison of the results of different research groups and the use of this method in clinical trials.

Key words: telomere; flow cytometry; real-time polymerase chain reaction; leukocytes.

For citation: Galtseva I.V., Filipenko M.L., Davydova Yu.O., Luchkin A.V., Kapranov N.M., Kondratieva Yu.A., Subbotin S.V., Khrapov E.A., Nikiforova K.A., Fidarova Z.T., Gaponova T.V., Mendeleeva L.P., Mikhailova E.A., Parovichnikova E.N., Savchenko V.G. Comparison of polymerase chain reaction and flow cytometry for measuring telomere length of human leukocytes. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021;66 (3): 154-159 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-3-154-159>

Для корреспонденции: Давыдова Юлия Олеговна, врач клин. лаб. диагностики лаборатории иммунофенотипирования клеток крови и костного мозга; e-mail: juliya89mur@yandex.ru

Information about authors:

Galtseva I.V., <http://orcid.org/0000-0002-8490-6066>;
Filipenko M.L., <http://orcid.org/0000-0002-8950-5368>;
Davydova Yu.O., <http://orcid.org/0000-0001-5932-0285>;
Luchkin A.V., <http://orcid.org/0000-0002-4400-4711>;
Kapranov N.M., <http://orcid.org/0000-0002-6512-910X>;
Kondratieva Yu.A., <http://orcid.org/0000-0002-9274-8029>;
Subbotin S.V., <http://orcid.org/0000-0003-2945-8886>;
Khrapov E.A., <http://orcid.org/0000-0003-0991-5349>;
Nikiforova K.A., <http://orcid.org/0000-0002-4119-7175>;
Fidarova Z.T., <http://orcid.org/0000-0003-0934-6094>;
Gaponova T.V., <http://orcid.org/0000-0002-9684-5045>;
Mendeleeva L.P., <http://orcid.org/0000-0002-4966-8146>;
Mikhailova E.A., <http://orcid.org/0000-0002-2449-2682>;
Parovichnikova E.N., <http://orcid.org/0000-0001-6177-3566>;
Savchenko V.G., <http://orcid.org/0000-0001-8188-5557>.

For correspondence: *Davydova Yu.O.*, Physician (clinical and laboratory diagnostics), Scientific and Clinical Laboratory for Immunophenotyping of Blood and Bone Marrow Cells; e-mail: juliya89mur@yandex.ru

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Conflict of interests. *The authors declare no conflict of interests.*

Received 26.02.2021
Accepted 06.03.2021

Введение. Теломерами называют концевые участки хромосом, которые состоят из tandemных нуклеотидных повторов (TTAGGG), соединенных с белками [1,2]. Теломеры выполняют несколько функций. Во-первых, они препятствуют деградации и слиянию хромосом, поддерживая тем самым целостность генома клетки. Во-вторых, участвуют в прикреплении хромосом к элементам ядерного матрикса, сохраняя внутреннюю упорядоченность клеточного ядра. И в-третьих, решают проблему недорепликации концевых участков ДНК, которая возникает в S-фазе клеточного цикла. В процессе удваивания (репликации) ДНК участвует фермент ДНК-полимеразы, которая синтезирует дочернюю комплементарную цепь только в одном направлении (5'→3') [3]. Кроме того, этот фермент не способен инициировать синтез ДНК de novo, а начинает присоединение нуклеотидов к специальному РНК-праймеру, или РНК-затравке, с ее 3'-конца, которая синтезируется другим ферментом – РНК-полимеразой. После окончания синтеза дочерней цепи, РНК-праймер удаляется с 5'-конца и пробел остается незаполненным, поэтому после каждого деления клетки происходит укорочение хромосом, в среднем, на 50-60 нуклеотидов [4]. Но так как это укорочение происходит за счет потерь теломерных повторов, количества которых хватает на несколько десятков делений, не происходит потери важной генетической информации, поэтому теломеры являются критически важными в поддержании и жизнеспособности клетки [5]. Помимо механизма укорочения теломер, в клетке есть и механизм восстановления их длины, который обеспечивается специальным ферментом – теломеразой, постоянная активность которой выявлена преимущественно в стволовых недифференцированных клетках. В специализированных клетках теломераза не активна, поэтому после ограниченного числа делений наступает апоптоз [6–9].

Укорочение теломер в клетках крови наблюдается при некоторых заболеваниях, в частности, при врожденном дискератозе, апластической анемии, циррозе печени, идиопатическом легочном фиброзе [10–12]. Большое количество исследований посвящено изучению роли теломер в канцерогенезе. Предполагается, что значительное укорочение длины теломер приводит к геномной нестабильности и

образованию хромосомных поломок, которые нередко обнаруживаются как при различных онкогематологических заболеваниях, так и солидных новообразованиях [13–16].

Несмотря на несомненную актуальность исследования, стандартизованный лабораторный метод определения длины теломер к настоящему моменту отсутствует. Золотым стандартом по данным литературы признается анализ концевых рестрикционных фрагментов с помощью блот-гибридизации по Саузерну. Однако этот метод достаточно трудоемкий, отсутствуют стандартные протоколы, воспроизводимость – низкая, присутствует субъективность анализа, а так же необходимость использования радиоактивных меток сильно ограничивает применение этого метода [17,18]. Более подходящими для рутинной практики могут быть полимеразная цепная реакция (ПЦР) в режиме реального времени и проточная цитометрия – flow-FISH, (объединение проточной цитометрии (flow cytometry) и флуоресцентной гибридации *in situ* (FISH)) [19–22].

В ряде исследований показаны достоинства метода flow-FISH, такие как высокая чувствительность, специфичность, воспроизводимость и возможность определения длины теломер в целевых популяциях клеток без предварительного сортирования [17]. Однако flow-FISH не может определить длину теломер в абсолютном выражении, то есть в килобазах (кб) – тысячах парах нуклеотидов. Этот метод позволяет определить относительную длину теломер (ОДТ), то есть относительно некоторого контроля, в роли которого обычно выступают клеточная линия 1301, клетки бычьего или мышинного тимуса или костного мозга мышей [23,24]. Применение разных контролей делает невозможным сопоставление результатов разных исследований.

Определение длины теломер с помощью ПЦР в режиме реального времени имеет свои преимущества, такие как простота выполнения, возможность проведения исследования образца даже с низким количеством ДНК, высокая пропускная способность, а главное, возможность получить абсолютную длину теломер (АДТ) [25]. Недостатком этого метода является низкая воспроизводимость, вариабельность результатов, трудности в определении длины коротких теломер [17].

Целью нашего исследования является сопоставление результатов измерения длины теломер методами ПЦР и flow-FISH, а также создание точного и надежного способа перевода относительной длины теломер (ОДТ), определенной методом flow-FISH, в абсолютную длину теломер в парах нуклеотидов (АДТ).

Материал и методы. Материалом для исследования служили образцы периферической крови с ЭДТА, полученные от 21 здорового донора. Соотношение мужчин к женщинам составило 15 : 6, возраст варьировал от 19 до 62 лет, медиана – 36 лет. Забор крови осуществлялся после подписания добровольного информированного согласия.

Flow-FISH. Мононуклеары периферической крови получали с помощью центрифугирования в градиенте плотности фикола 1,077 г/см³. Для определения длины теломер полученных мононуклеаров использовали коммерческий набор Telomere PNA Kit/FITC (Dako, Дания). В качестве контроля гибридизации зонда использовали клеточную линию 1301 (АТСС, Великобритания). Клетки линии 1301 выращивали в суспензионной культуре в среде RPMI 1640 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки при температуре +37 °С, 5 % CO₂. До использования клетки хранились при температуре -80° С в криобриках.

В состав набора Telomere PNA Kit/FITC входит два типа растворов. Первый содержит пептидно-нуклеиновый зонд, комплементарный последовательности теломерных повторов, меченый флуоресцентным красителем флуоресцеин-изоотиоцианатом (fluorescein isothiocyanate, FITC). Второй раствор представляет собой буфер для гибридизации, но не содержит зонд. Два миллиона выделенных мононуклеаров смешивали с двумя миллионами клеток линии 1301, затем разделяли на 4 равные части в разные пробирки и добавляли в две пробирки раствор с зондом и в две другие пробирки раствор без зонда. После гибридизации и инкубации проводили отмывку от не связанного зонда. Получали пробирку с зондом (исследуемая проба) и пробирку без зонда (контрольная проба) в двух повторах. Далее проводили цитометрический анализ. Вся пробоподготовка выполнялась в соответствии с рекомендациями производителя набора.

Анализ клеток выполняли параллельно на двух цитометрах CytoFLEX (Beckman Coulter, КНР) и BD FACSCanto II (Becton Dickinson, США). Перед новой серией измерений проводили калибровку цитометра CytoFLEX с целью поддержания выхода флуоресцентного сигнала с помощью набора FluoroSpheres 6-Peak, Sensitivity Particles (Dako, Дания). Регулировка напряжения на фотоумножителях цитометра BD FACSCanto II проводилась с применением Cytometer Setup & Tracking Beads kit (BD Biosciences, США).

Гейтирование выполняли с помощью программы Kaluza 2.1 (Beckman Coulter, США). Определяли среднюю интенсивность флуоресценции (СИФ) по каналу FITC для мононуклеаров и клеток линии 1301. В пробах, инкубированных с гибридизационным буфером без зонда, СИФ отражала аутофлуоресценцию клеток, которую вычитали из СИФ от проб, инкубированных с зондом. Затем подсчитывали среднее значение полученных разниц СИФ.

Набор FluoroSpheres 6-Peak, Sensitivity Particles применяли для построения калибровочных прямых с целью перевода полученных средних СИФ к показателю молекулярного эквивалента флуоресценции (МЭФ). Подробное описание гейтирования, переход от СИФ к МЭФ

представлено в исследованиях Дёминой И.А. с соавт. (2018) и Rufer N. с соавт. (1998) [23,26].

ПЦР в реальном времени. Получение стандартных плазмидных образцов, содержащих известное число теломерных повторов. Реакционную смесь объемом 40 мкл, содержащую олигонуклеотиды k-tl1 5'-TTAGGTTAGGGTTAGGGT-3' и k-tl2 5'-AACCCCTAACCCCTAACCCCT-3' в концентрации 3 мкМ, 10 mM Tris, pH 7.5, 50 mM NaCl и 2 mM EDTA, подвергали денатурации в течение 5 мин при 95 °С и медленному охлаждению до комнатной температуры с целью формирования двухцепочечного олигонуклеотида с «липкими» концами. Полученную ДНК подвергали самолигированию в присутствии лигазы T4 и киназы T4 в течение 3 ч при 8 °С. Репарировали концы ДНК добавлением dNTP до 200 мкМ и 2,5 ед. акт ДНК-полимеразы T4 в течение 20 мин при 37 °С. Далее прогревали смесь 15 мин при 65 °С. Доводили объем до 100 мкл водой и добавляли 100 мкл ресуспендированных магнитных частиц Agcount (Beckman). Перемешивали и инкубировали 5 мин, собирали частицы на магните, супернатант отбрасывали и промывали частицы два раза 400 мкл 75% спирта в 10 mM TrisHCl pH8. Высушивали частицы в течение 10 мин при 37 °С с открытой крышкой. Элюировали ДНК в 30 мкл воды. Полученные конкатомеры ДНК лигировали с плазмидой pBluscript-ISK(+), лианеризованной эндонуклеазой рестрикции EcoRV, трансформировали полученной лигазной смесью компетентные клетки E.coli XL-blue I. Отобранные рекомбинантные плазмиды подвергали секвенированию по Сенгеру на автоматическом секвенаторе ABI 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) с использованием набора Big dye 3.1 (Центр коллективного пользования «Геномика», ИХБФМ СО РАН) с целью оценки количества проклонированных теломерных повторов. Плазмидные ДНК pTL17 (17 повторов) и pTL17 (28 повторов) выделяли из 100 мл ночной культуры в среде LB с помощью QIAGEN Plasmid Midi Kit (QIAGEN) согласно инструкции фирмы производителя.

Получение калибраторов. Концентрацию полученных стандартных плазмидных ДНК определяли флуорометрически (набор Qubit™ BR, Invitrogen) по следующему протоколу: 2 мкг ДНК подвергали гидролизу эндонуклеазой рестрикции EcoRI для линейаризации. Полученные линейные стандарты разводили до концентрации 10⁷-10¹ копий плазмидной ДНК на мкл в стерильном буфере, содержащем 10 mM TrisHCl pH7,6 и ДНК фага лямбда 5 нг на мкл. Концентрацию ДНК в полученных стандартах уточняли с использованием цифровой ПЦР фрагмента гена бета-лактамазы на платформе QX100™ Droplet Digital™ PCR System (Bio-Rad, США) согласно инструкциям фирмы-производителя. Для этого готовили 20 мкл ПЦР-смеси, содержащей исследуемую ДНК (<66 нг на 20 мкл), 1X ПЦР-смесь (Bio-Rad), 600 нМ олигонуклеотидные праймеры Blac-U 5'-CGTCGTTTGGTATGGCTTCATTC-3' и Blac-R 5'-AGGACCGAAGGAGCTAACCCG-3', 150 нМ зонд Blac-P 5'-HEX-CGGTCCCAACGATCAAGGCGAG-BHQ2-3'. Для получения микрокапель 20 мкл приготовленной ПЦР-смеси и 70 мкл масла для генерации капель помещали в соответствующие лунки картриджа DG8. 40 мкл полученных микрокапель переносили в 96-луночную ПЦР-плашку, запечатывали фольгой и помещали в амплификатор. Программа амплификации: 96 °С – 10 мин и далее 50 циклов 96 °С – 15 сек, 58 °С – 40 сек с фи-

нальным прогревом в течение 10 мин при 98°C. После этого микрокапли подвергали считыванию с помощью прибора Droplet Reader, полученные данные обрабатывали в программе QuantaSoft (Bio-Rad, США).

Количественный анализ теломерных повторов методом ПЦР в режиме реального времени. Для количественного анализа количества теломерных повторов проводили две количественных ПЦР: одну для теломерных повторов, другую для определения количества геном-эквивалентов ДНК. Первая смесь для ПЦР (объемом 20 мкл) содержала 300 нМ telg 5'-ACACTAAGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTAGTGT-3' и telc 5'-TGTTAGGTATCCSTATCCCTATCCSTATCCSTATCCСТААСА-3', а также 1x буфер для Taq-полимеразы (65 мМ Tris-HCl (pH 8,9); 15 мМ (NH₄)₂SO₄; 0,05% Tween 20; 3 мМ MgCl₂), 0,2 мМ дНТФ, 1x SybrGreenI, 1 е.а. Taq-полимеразы («Биосинтек», Россия) и 5-50 нг геномной ДНК человека. Реакцию амплификации проводили в амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США), согласно следующей программе: 15 мин при 95 °С начальной денатурации для активации фермента, 2 цикла – 10 с при 95 °С, 20 с при 49 °С, 38 циклов: 10 с при 95 °С, 30 с при 60 °С, сьем флуоресцентного сигнала на каналах FAM, 10 с при 72 °С сьем флуоресцентного сигнала на каналах FAM. Вторая смесь для ПЦР (объемом 20 мкл) содержала 450 нМ RPP-U 5'-GATTTGGACCTGC-GAGCG-3', RPP-R 5'-GCGGTGTCTCCACAAGT-3', ALB-U 5'-GACTTGCCAAGACATATGAAACC-3', ALB-R 5'-TCCAACAATAAACCTACCACCTTTG-3' и 100 нМ зонды ALB-FAM 5'-FAM-TGCTGTGCCGCTGCAGATCC-BHQ1-3' RPN-H 5'-HEX-TCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG-BHQ1-3', а также 1x буфер для Taq-полимеразы (65 мМ Tris-HCl (pH 8,9); 20 мМ (NH₄)₂SO₄; 0,05% Tween 20; 3,5 мМ MgCl₂), 0,2 мМ дНТФ, 1 е.а. Taq-полимеразы («Биосинтек», Россия) и 5-50 нг геномной ДНК человека. Реакцию амплификации проводили в амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США), согласно следующей программе: 15 мин при 95 °С начальной денатурации для активации фермента, 39 циклов: 10 с при 95 °С, 30 с при 60 °С, сьем флуоресцентного сигнала на каналах FAM/HEX, 10 с при 72 °С. Для каждого образца анализ проводили в трех повторах, для построения калибровочной кривой использовали стандартные образцы 10⁹, 10⁸, 10⁷ копий на мкл для ПЦР1 и 10⁵, 10⁴, 10³ копий на мкл для ПЦР2. Количество копий анализируемых ДНК мишеней рассчитывали по формуле, выведенной из графика калибровочной кривой с помощью программного обеспечения к соответствующему прибору. Полученные абсолютные значения числа копий теломер нормализовали путем деления на количество геном-эквивалентов, рассчитанное как среднее арифметическое абсолютных значений двух однокопийных locus: гена альбумина и рибонуклеазы Р.

Статистический анализ данных. Статистическая обработка выполнена с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 6 и R 3.4.4. Корреляционный анализ выполняли с использованием критерия Пирсона, так как выборки были с нормальным распределением. Проверку нормальности распределения осуществляли с помощью критерия Шапиро-Уилка. При анализе линейной регрессии проверяли остатки регрессии (остатки регрессии – это разности между наблюдаемыми значениями и значениями, рассчитанными по полученному

уравнению регрессии) на гомоскедастичность (гомоскедастичность – постоянство дисперсий случайных ошибок модели) и нормальность распределения. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты. На первом этапе нами была оценена воспроизводимость молекулярного эквивалента флуоресценции (МЭФ), полученная от одних и тех же проб на разных цитометрах. Нами обнаружена сильная прямая связь между МЭФ, полученными при анализе проб на BD FACSCanto II и CytoFLEX ($r = 0,97$; $p < 0,0001$). Рассчитано уравнение регрессии $y = 0,84x$, где x – это МЭФ от CytoFLEX, а y – МЭФ от BD FACSCanto II. Доверительный интервал для коэффициента a (ДИ) составил 0,81-0,86. На рис.1 представлена взаимосвязь МЭФ одних и тех же проб на разных цитометрах.

При корреляционном анализе результатов ПЦР и результатов flow-FISH была обнаружена значимая взаимосвязь между абсолютной длиной теломер (АДТ) и МЭФ, полученных на BD FACSCanto II и CytoFLEX (рис. 2, а, в). Мы рассчитали уравнения зависимости АДТ от МЭФ для обоих приборов, которые можно использовать для перевода МЭФ в абсолютные значения длины теломер для других проб (для CytoFLEX: $y = 0,0043x$ (ДИ = 0,0040 – 0,0046); для BD FACSCanto II: $y = 0,0051x$ (ДИ = 0,0048 – 0,0055)).

По регрессионным моделям для CytoFLEX и BD FACSCanto II были подтверждены гомоскедастичности ($p = 0,10$ и $p = 0,09$) и нормальности распределения остатков регрессии ($p = 0,29$ и $p = 0,35$ соответственно). Распределение остатков регрессии в зависимости от входящих параметров показано на рис. 2, б, г. Проведенные проверки регрессионного анализа указывают на правомерность применения выведенных уравнений для перевода МЭФ в АДТ.

Обсуждение. Определение длины теломер является важной задачей, решение которой представляет интерес как в фундаментальных исследованиях, так и в клинической лабораторной практике и клинической практике врача [27–30].

Методы, которые применяются для определения длины теломер, разнообразны и имеют разную физическую основу. В нашем исследовании мы показали значительную сходимость результатов определения длины теломер методами ПЦР и flow-FISH. Работ, посвященных прямому сравнению нескольких способов измерения длины теломер, к настоящему времени не так много. По результатам одной из них обнаруживалась значимая корреляция данных ПЦР и flow-FISH, но только в группе здоровых доноров ($R^2 = 0,33$; $p < 0,0001$). Взаимосвязь этих методов в группе пациентов с синдромом недостаточности костного мозга не была достоверной ($R^2 = 0,1$; $p = 0,08$). Авторы объясняют это преаналитическими факторами, в частности качеством образцов. Низкая клеточность крови пациентов, вероятно, приводила к неточности результатов ПЦР [17].

Полученные нами высокие значения коэффициента Пирсона (r) и коэффициента детерминации (R^2) позволяют провести линейный регрессионный анализ. Проверка гомоскедастичности и нормальности распределения остатков показала правомерность полученных уравнений линейной регрессии. Эти уравнения можно будет использовать для перевода относительных значений флуоресценции в абсолютные значения длины теломер, что является немаловажным в клинической практике.

Как указывалось ранее, flow-FISH позволяет получить только относительную длину теломер (ОДТ), что делает мало сопоставимыми результаты разных иссле-

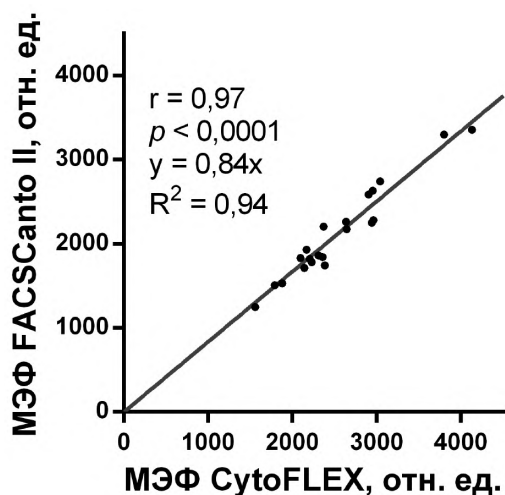


Рис.1. Взаимосвязь между показателями МЭФ, полученных от одних и тех же проб на цитометрах BD FACSCanto II и CytoFLEX.

довательских групп. Поэтому разрабатываются подходы для пересчета флуоресценции в абсолютную длину в килобазах. Например, показана возможность пересчета АДТ, используя клеточную культуру 1301 и зная тот факт, что длина теломер этих клеток равна приблизительно 70 килобазам (кб) [26]. В другом исследовании сопоставляли результаты flow-FISH и результаты анализа концевых рестрикционных фрагментов Саузерн-блотом. Получив значимую корреляцию ($r = 0,9$; $p < 0,0001$) авторы получали уравнение линейной регрессии [23]. Аналогичный подход использовался и в данной работе.

Обращает на себя внимание, что полученные уравнения регрессии несколько отличаются для разных цитометров, несмотря на то, что мы использовали одни и те же частицы для расчета МЭФ. С одной стороны, высокая сходимость анализа данных, полученных с двух цитометров, указывает на стабильность и воспроизводимость метода. С другой стороны, пересчитанные значения МЭФ при анализе на BD FACSCanto II были в среднем на 15% ниже, чем при анализе на CytoFLEX, что отражено в уравнении регрессии. Поэтому, даже использование одного и того же

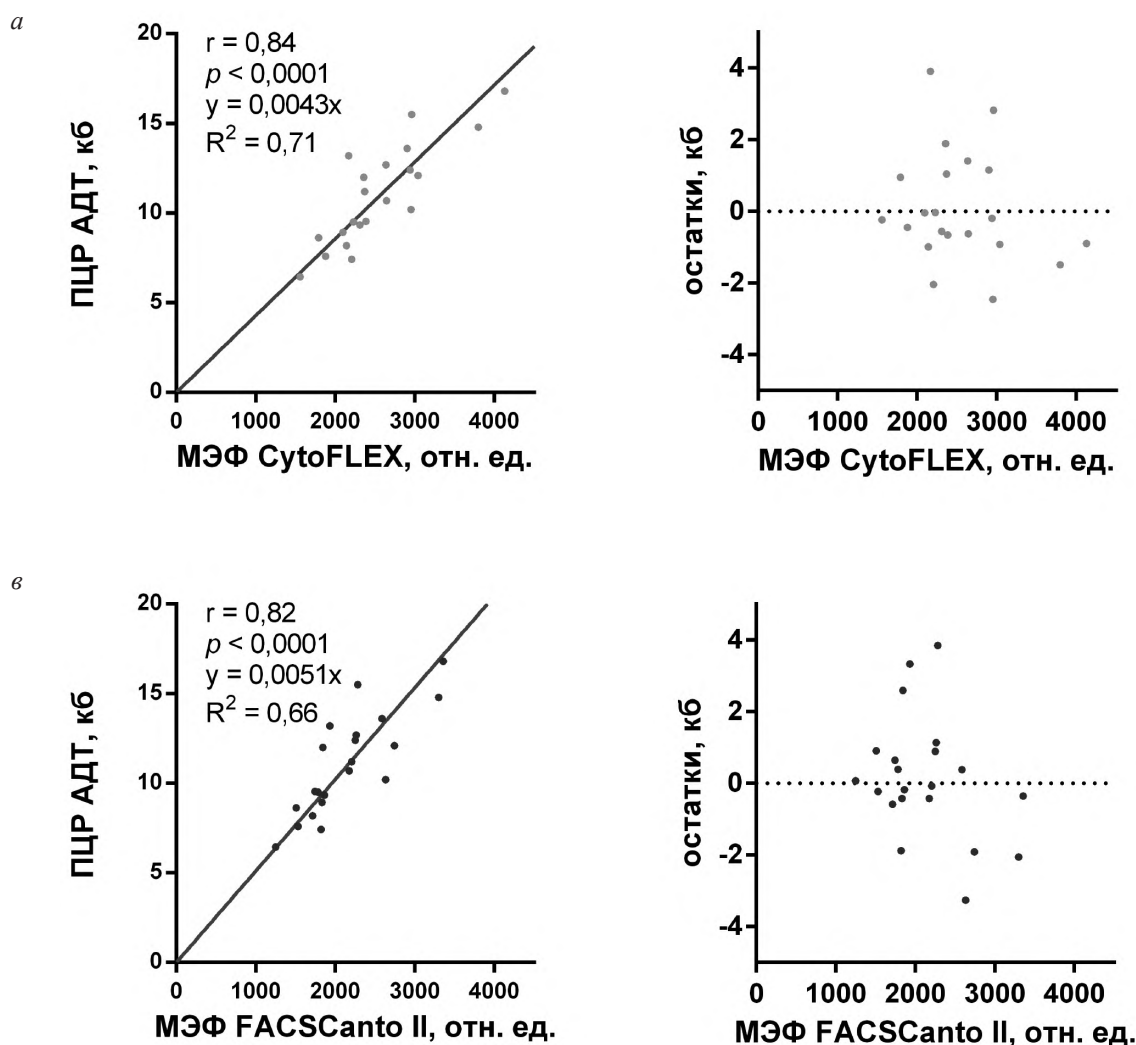


Рис. 2. Результаты регрессионного анализа. *а* – взаимосвязь АДТ, определенных методом ПЦР, и МЭФ, подсчитанных на цитометре CytoFLEX; *б* – МЭФ, подсчитанные на цитометре CytoFLEX, и соответствующие остатки линейной регрессии; *в* – взаимосвязь АДТ, определенных методом ПЦР, и МЭФ, подсчитанных на цитометре BD FACSCanto II; *г* – МЭФ, подсчитанные на цитометре BD FACSCanto II, и соответствующие остатки линейной регрессии.

набора, контроля и частиц для пересчета МЭФ, не решает проблемы различия между разными цитометрами. Следовательно, при планировании многоцентровых исследований, является необходимым построение калибровочных прямых и выведения уравнения для пересчета АДТ в индивидуальном порядке. Кроме того, эти уравнения можно применять только при условии сохранения флуоресцентного сигнала на постоянном уровне, а это значит, что калибровка прибора является обязательной, так как способствует сохранению воспроизводимости данных.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности. Авторы выражают благодарность Дризе Н.И., Петинати Н.А. (НМИЦ гематологии Минздрава России) за проведенную работу по культивированию клеток; Попову А.М., Дёминой И.А. (НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России), Борисову В.И. (ООО Новартис Фарма) за помощь в освоении методики по определению длины теломер методом проточной цитометрии, а также предоставленную клеточную культуру.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-5, 8-10, 13-17, 19-23, 25, 27-30 см. REFERENCES)

- Богданов А. Теломеры и теломераза. *Соросовский образовательный журнал*. 1998;(12):12-8.
- Егоров Е.Е. Теломеры, теломераза, канцерогенез и мера здоровья. *Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика*. 2010;3(2):184-95.
- Демина И.А., Овсянникова Г.С., Калинина И.И., Сунцова Е.В., Горонкова О.В., Райкина Е.В. и др. Значение длины теломер для индивидуализации терапии апластической анемии. *Педиатрия Журнал им ГН Сперанского*. 2017;96(5):97-103.
- Кулагин А.Д., Борисов В.И., Пронкина Н.В., Лисуков И.А., Козлов В.А., Афанасьев Б.В. Частота и прогностическое значение укорочения теломерных участков ДНК при апластической анемии. *Гематология и трансфузиология*. 2014;59(S1):20.
- Борисов В.И., Демаков С.А., Непомнящих В.М., Леонова М.И., Демина Д.В., Баровская Н.А. и др. Особенности изменения средней длины теломер в лимфоцитах у больных бронхиальной астмой. *Медицинская иммунология*. 2009;11(6):523-30.
- Борисов В.И., Кожевников В.С., Сениуков В.В., Сизиков А.Э., Коненкова Л.П., Герцог О.А. и др. Укорочение длины теломер моноцитов при ревматоидном артрите. *Медицинская иммунология*. 2006;8(1):87-90.
- Дёмина А.И., Семченкова А.А., Кагирова З.Р., Попов А.М. Измерение абсолютной длины теломер методом проточной цитометрии. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии*. 2018; 17 (4): 66–72.

REFERENCES

- Blackburn E.H., Greider C.W., Szostak J.W. Telomeres and telomerase: The path from maize, Tetrahymena and yeast to human cancer and aging. *Nat. Med.* 2006;12(10):1133-8.
- Palm W., De Lange T. How shelterin protects mammalian telomeres. *Annu Rev Genet.* 2008;42:301-34.
- Levy M.Z., Allsopp R.C., Fitcher A.B., Greider C.W., Harley C.B. Telomere end-replication problem and cell aging. *J. Mol. Biol.* 1992;225(4):951-60.
- Blackburn E.H. Telomere states and cell fates. *Nature*. 2000;408(6808):53-6.
- Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 1965;37(3):614-36.
- Bogdanov A. Telomeres and telomerase. *Sorosovskij obrazovatel'nyj zhurnal*. 1998;(12):12-8. (in Russian)
- Yegorov Y.E. Telomeres, telomerase, oncogenesis and measure of health. *Klinicheskaja onkogematologija. Fundamental'nye issledo-*

- vaniya i klinicheskaja praktika*. 2010;3(2):184-95. (in Russian)
- Blackburn E.H. Switching and signaling at the telomere. *Cell*. 2001;106(6):661-73.
- Greider C.W. Telomere Length Regulation. *Annu Rev. Biochem.* 1996;65(1):337-65.
- Calado R.T., Young N.S. Mechanisms of disease: Telomere diseases. *N. Engl. J. Med.* 2009;361(24): 2353–65.
- Demina I.A., Ovsyannikova G.S., Kalinina I.I., Suntsova E.V., Goronkova O.V., Raikina E.V., et al. Telomere length value for individualization of aplastic anemia therapy. *Pediatriya*. 2017; 96(5):97-103. (in Russian)
- Kulagin A.D., Borisov V.I., Pronkina N.V., Lisukov I.A., Kozlov V.A., Afanas'ev B.V. Frequency and prognostic value of telomeric DNA regions shortening in aplastic anemia. *Gematologija i transfuziologija*. 2014;59(S1):20. (in Russian)
- Engelhardt M., Mackenzie K., Drullinsky P.R., Silver R.T., Moore M.A.S. Telomerase activity and telomere length in acute and chronic leukemia, pre- and post-ex vivo culture. *Cancer Res.* 2000;60(3):610-7.
- Cottliar A., Pedrazzini E., Corrado C., Engelberger M.I., Narbaitz M., Slavutsky I. Telomere shortening in patients with plasma cell disorders. *Eur. J. Haematol.* 2003;71(5):334-40.
- Boultonwood J., Fidler C., Kusec R., Rack K., Elliott P.J.W., Atoyebi O., et al. Telomere length in myelodysplastic syndromes. *Am J Hematol.* 1997;56(4):266-71.
- Kim N.W., Piatyszek M.A., Prowse K.R., Harley C.B., West M.D., Ho P.L., et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*. 1994;266(5193):2011-5.
- Gutierrez-Rodriguez F., Santana-Lemos B.A., Scheucher P.S., Alves-Paiva R.M., Calado R.T. Direct comparison of Flow-FISH and qPCR as diagnostic tests for telomere length measurement in humans. *PLoS One*. 2014;9(11):e113747.
- Borisov V.I., Demakov S.A., Nepomnyashchikh V.M., Leonova M.I., Demina D.V., Barovskaya N.A., et al. Some features of changing telomere length in lymphocytes from the patients with bronchial asthma. *Med. Immunol.* 2009;11(6):523-30. (in Russian)
- Baerlocher G.M., Mak J., Tien T., Lansdorp P.M. Telomere length measurement by fluorescence in situ hybridization and flow cytometry: Tips and pitfalls. *Cytometry*. 2002;47(2):89-99.
- Law H.K.W., Lau Y.L. Validation and development of quantitative flow cytometry-based fluorescence in situ hybridization for intercenter comparison of telomere length measurement. *Cytometry*. 2001;43(2):150-3.
- Gil M.E., Coetzer T.L. Real-time quantitative PCR of telomere length. *Appl. Biochem. Biotechnol. – Part B Mol. Biotechnol.* 2004;27(2):169-72.
- O'Callaghan N.J., Dhillon V.S., Thomas P., Fenech M. A quantitative real-time PCR method for absolute telomere length. *Biotechniques*. 2008;44(6):807-9.
- Rufer N., Dragowska W., Thornbury G., Roosnek E., Lansdorp P.M. Telomere length dynamics in human lymphocyte subpopulations measured by flow cytometry. *Nat. Biotechnol.* 1998;16(8):743-7.
- Borisov V.I., Kozhevnikov V.S., Seniukov V.V., Sizikov A.E., Konenkova L.P., Gerzog O.A. et al. Telomere shortening in monocytes of the patients with rheumatoid arthritis. *Meditsinskaya immunologiya*. 2006;8(1):87-90. (in Russian)
- Cawthon R.M. Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(3):e21.
- Demina A.I., Semchenkova A.A., Kagirova Z.R., Popov A.M. Flow cytometric measurement of absolute telomere length. *Voprosy gematologii/onkologii i immunopatologii v pediatrii*. 2018; 17 (4): 66–72. (in Russian)
- Wynn R.F., Cross M.A., Hatton C., Will A.M., Lashford L.S., Dexter T.M., et al. Accelerated telomere shortening in young recipients of allogeneic bone-marrow transplants. *Lancet*. 1998;351(9097):178-81.
- Zimmermann S., Glaser S., Ketteler R., Waller C.F., Klingmüller U., Martens U.M. Effects of telomerase modulation in human hematopoietic progenitor cells. *Stem. Cells*. 2004;22(5):741-9.
- Graham M.K., Meeker A. Telomeres and telomerase in prostate cancer development and therapy. *Nat. Rev. Urol.* 2017;14(10): 2607-19.
- Heaphy C.M., Meeker A.K. The potential utility of telomere-related markers for cancer diagnosis. *J. Cell Mol. Med.* 2011;15(6):1227-38.