

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ  
БЕЛАРУСЬ



УТВЕРЖДАЮ  
Первый заместитель Министра

Д.Л.Пиневич

« 03 июля » 2020 г.

Регистрационный № 037-0520

Метод определения опухолевых клеток в костном мозге при  
нейробластоме

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: государственное учреждение  
«Республиканский научно-практический центр детской онкологии,  
гематологии и иммунологии».

АВТОРЫ: к.м.н., доцент И.В. Пролесковская, И.В. Пахомова, Е.П.  
Вашкевич, Е.В. Кушнерова, Т.В. Райко, д.м.н., профессор,  
член-корреспондент НАН Беларуси О.В. Алейникова, д.м.н., профессор  
Н.Е. Конопля.

Минск, 2020

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

\_\_\_\_\_ Д. Л. Пиневиц

04.06.2020

Регистрационный № 037-0520

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК В КОСТНОМ  
МОЗГЕ ПРИ НЕЙРОБЛАСТОМЕ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУ «Республиканский научно-практический  
центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»

АВТОРЫ: канд. мед. наук, доц. И. В. Пролесковская, И. В. Пахомова,  
Е. П. Вашкевич, Е. В. Кушнерова, Т. В. Райко, д-р мед. наук, проф., чл.-корр. НАН  
Беларуси О. В. Алейникова, д-р мед. наук, проф. Н. Е. Конопля

Минск 2020

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод определения опухолевых клеток в костном мозге при диагностике и на этапах терапии, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на оценку поражения опухолевыми клетками костного мозга у пациентов с нейробластомой.

Метод, изложенный в настоящей инструкции, предназначен для врачей лабораторной диагностики, врачей-онкологов и иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с нейробластомой в стационарных и/или амбулаторных условиях, и/или в условиях отделений дневного пребывания.

### **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ**

1. Термоциклер для полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени.
2. Термоциклер.
3. Спектрофлуориметр.
4. Дозаторы для работы с объемами растворов в диапазоне от 0,1 до 1000 мкл.
5. Центрифуга с возможностью охлаждения.
6. Вортекс.
7. Микроскоп световой.
8. Камера Горяева.
9. Центрифуга для приготовления цитологических препаратов (цитоспин).
10. Нагревательный столик для стекол.
11. Морозильная камера с возможностью поддержания температуры -20 и -80 °С.
12. Проточный цитофлуориметр.
13. Жидкостный хроматограф.
14. Масс-спектрометр.
15. Весы аналитические;
16. Система вакуумной фильтрации растворителей.
17. Центрифуга.
18. Сухожаровой шкаф.
19. Флуоресцентный микроскоп (общее увеличение x1000; объектив x100 подпружиненный, для масляной иммерсии).
20. Вытяжной шкаф.
21. Водяные бани-термостаты.
22. Микроцентрифуга-вортекс.
23. Гибридизатор (с возможностью охлаждения рабочей поверхности от 85 до 37 °С в течение 1 мин).
24. Холодильник (от 2 до 8 °С).
25. Одноразовые наконечники для дозаторов объемом 10, 100, 200 и 1000 мкл с аэрозольным барьером для дозаторов.
26. Пробирки «эппендорф» объемом 0,2; 0,5 и 1,5 мл.

27. Низкопрофильные 96-луночные плашки.
28. Оптические самоклеющиеся пленки.
29. Пробирки для взятия биоматериала с  $K_2$ ЭДТА.
30. Пробирки для проточного цитофлуориметра.
31. Шприцевые фильтры нейлоновые с размером пор 0,2 мкм и диаметром 25 мм.
32. Мембранные фильтры из нейлона для системы вакуумной фильтрации растворителей с размером пор 0,45 мкм и диаметром 47 мм.
33. Одноразовые стерильные пробирки объемом 12 и 15 мл.
34. Ситечки для клеточной культуры с размером пор 100 мк.
35. Предметные стекла.
36. Покровные стекла разных размеров: 18x18; 22x22 и 24x24 мм.
37. Штативы для пробирок.
38. Ванночка для льда.
39. Буфер лизирующий для эритроцитов.
40. Натрий-фосфатный буфер.
41. Изопропанол.
42. Хлороформ.
43. Этанол.
44. Реагенты для синтеза кДНК.
45. Готовая смесь для ПЦР в реальном времени для использования с флуоресцентно мечеными зондами TaqMan (2×).
46. Праймеры и флуоресцентно-меченые зонды.
47. Деионизированная вода.
48. Градиент плотности (1077).
49. Физиологический раствор NaCl.
50. Бычий сывороточный альбумин.
51. Параформальдегид.
52. АРААР комплекс (визуализирующий реагент для иммуноцитохимии).
53. Система фуксин-субстрат-хромоген.
54. Краситель гематоксилин.
55. Глицерин-содержащая среда для покрытия препарата.
56. Очищенное мышинное моноклональное антитело к человеческому ганглиозиду на поверхности клеток нейробластомы (GD2).
57. Промывочные растворы к проточному цитофлуориметру.
58. Моноклональные антитела кластера дифференцировки (CD) CD45, CD56, CD81 и флуоресцентный краситель нуклеиновых кислот Syto16-Green для проточной цитометрии.
59. Реактивы для лизиса эритроцитов и фиксации образцов для проточной цитометрии.
60. Метанол.
61. Ледяная уксусная кислота.
62. Натрий-фосфатный буфер.

## **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Нейробластома (МКБ-10: C00.0–C74.9).

## **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ**

Отсутствуют.

## **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА**

Поражение костного мозга при нейробластоме фокальное. Оценку поражения костного мозга проводят несколькими технологиями: проточная цитофлуориметрия, ПЦР-анализ в режиме реального времени и иммуногистохимический метод. Необходимы костномозговые аспираты как минимум из 4-х различных точек.

**Полуколичественная оценка экспрессии генов тирозингидроксилазы (TH) и ген гомеодоменного транскрипционного фактора PNOX2B (PNOX2B) с использованием ПЦР в режиме реального времени**

Костный мозг в объеме равном 2 мл осаждают 10 мин при 1500 об/мин и отбирают около 85 % плазмы. Лизируют в 10 мл буфера для лизиса эритроцитов в течение 10 мин при комнатной температуре. Лизат осаждают в течение 10 мин при 1500 об/мин при 4 °С и супернатант удаляют. Дважды отмывают в 15 мл натрий-фосфатного буфера и проводят подсчет клеток в камере Горяева.

Выделение тотальной рибонуклеиновой кислоты (РНК) осуществляется из осадка, содержащего  $5-10 \times 10^6$  клеток методом гуанидин тиоцианат-фенол-хлороформной экстракции. На матрице тотальной РНК производится синтез кДНК с использованием рандомных гексамеров.

Определение показателей экспрессии генов *TH* и *PNOX2B* осуществляется методом полуколичественной ПЦР в режиме реального времени. В качестве эндогенного контроля используется ген *GUS*. В таблице представлены олигонуклеотидные последовательности используемых праймеров и зондов. В состав реакции (25 мкл) входят следующие компоненты: готовая смесь для ПЦР в реальном времени с пробами TaqMan (2×) — 12,5 мкл; смесь праймеров и флуоресцентно меченого зонда — 1,25 мкл, кДНК в количестве, эквивалентном 100 нг РНК (5 мкл); деионизированная вода до конечного объема. Условия амплификации включают первичную денатурацию в течение 10 мин при 95 °С, 50 циклов с последующей сменой условий кондиционирования (10 с при 95 °С, 40 с при 60 °С). Количество мРНК исследуемых генов анализируется в триплетах с подсчетом среднего значения *St* для каждого гена. При значении *St* гена *GUS* выше 30 цикла образец исключается из исследования в связи с низким качеством/количеством кДНК.

Таблица — Последовательности праймеров и гибридационного флуоресцентно меченого зонда для амплификации *GUS* и *PHOX2B*

Название олигонуклеотида	Последовательность олигонуклеотида, 5' → 3'
<i>GUS</i> enf1102	GAAAATATGTGGTTGGAGAGCTCATT
<i>GUS</i> enr1162	CCGAGTGAAGATCCCCTTTTTA
<i>GUS</i> enr1142	FAM – CCAGCACTCTCGTCGGTGA CTGTTCA – BHQ11
<i>TH_F</i>	ATTGCTGAGATCGCCTTCCA
<i>TH_R</i>	AATCTCCTCGGCGGTG TACTC
<i>TH_Pr</i>	FAM – ACAGGCACGGCGACCCGATTC – BHQ1
<i>PHOX2B_F</i>	TGCTGACTTCAGTTCCTGCA
<i>PHOX2B_R</i>	CCGTGGTCCGTGAAGAGTTT
<i>PHOX2B_Pr</i>	FAM – AGCAGTCCGTACGCCGAGTTCCT – BHQ1

Для подсчета результатов используется метод сравнения  $2^{\Delta Ct}$  (формулы 1 и 2), результат ПЦР был выражен в относительном уровне экспрессии гена-мишени (RGE).

$$\Delta Ct = Ct \text{ эндогенного контроля} - Ct \text{ образца}, \quad (1)$$

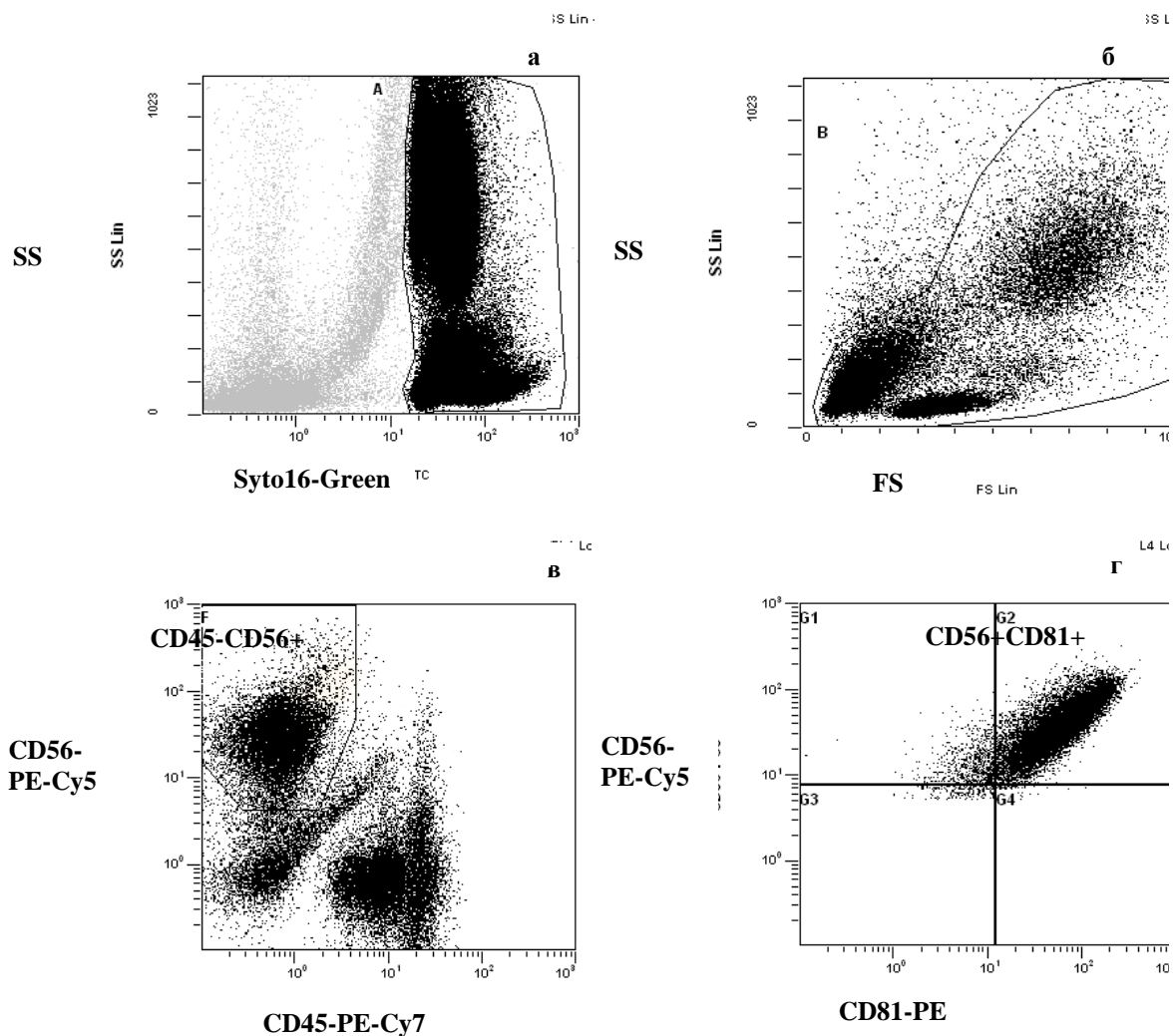
$$RGE = 2^{\Delta Ct} \quad (2)$$

Таким образом, получается значение уровня экспрессии искомого гена, нормализованное по уровню экспрессии гена эндогенного контроля, выраженное в относительных единицах экспрессии (о.е.э.) в диапазоне от 0 до 1, если  $Ct$  мишени  $\leq Ct$  эндогенного контроля. Если  $Ct$  мишени  $> Ct$  эндогенного контроля, что может наблюдаться в случае преобладания опухолевых клеток в исследуемом материале, значение RGE будет более 1. Чувствительность метода составляет  $10^{-4}$  -  $10^{-5}$ .

#### **Проточная цитофлуориметрия для выявления клеток с экспрессией CD45-CD56+CD81+**

Образец КМ (100–200 мкл) помещают в сухие пробирки для проточной цитофлуориметрии, добавляют флуоресцентный краситель нуклеиновых кислот Syto16-Green и моноклональные антитела в следующей комбинации: CD81-PE/CD56-PE-Cy5/ CD45-PE-Cy7 согласно инструкции производителя. Затем образцы перемешивают и инкубируют в течение 20 мин при комнатной температуре в темноте. После инкубации производят лизирование эритроцитов и фиксацию образцов с использованием соответствующих растворов.

Учет и анализ результатов проводят на проточном цитофлуориметре. В ходе анализа на графиках Syto16-Green/SS и прямого и бокового светорассеяния FS/SS выделяют ядросодержащие и жизнеспособные клетки (рисунок а, б). Учитывают не менее 500 тысяч таких клеток. Затем на графиках выделяют регион CD45-CD56+ клеток, среди которых определяют CD81+ популяцию (рисунок в, г). Атипичные клетки преимущественно имеют высокую экспрессию CD56 маркера. Количество опухолевых клеток с фенотипом Syto16+CD45-CD56+CD81+ выражают как процент от всех ядросодержащих жизнеспособных клеток. Положительным считается результат  $\geq 0,01$  % (чувствительность метода  $10^{-3}$ ).



- а — анализ распределения клеток по связыванию Syto16-Green;  
 б — анализ распределения клеток по интенсивности прямого (FS)  
 и бокового (SS) светорассеяния;  
 в — анализ распределения клеток по связыванию CD 45-PC7  
 и CD56-PE-Cy5.  
 г — анализ распределения клеток по связыванию CD81-PE  
 и CD56-PE-Cy5

**Рисунок — Алгоритм идентификации опухолевых клеток  
 в образце костного мозга пациента с нейробластомой**

### **Иммуноцитохимический анализ GD2-положительных клеток при нейробластоме**

При первичной обработке биоматериала выделяют мононуклеарные клетки на градиенте плотности (1077). Из полученных мононуклеарных клеток готовят шесть препаратов-цитоспинов диаметром 17 мм, содержащих  $5 \times 10^5$  клеток. Перед иммуноцитохимической окраской препараты выдерживают 10 мин в закрытом боксе при комнатной температуре. Затем цитоспины фиксируют 4 %-м параформальдегидом в течение 10 мин. После фиксации препарат трижды

промывают натрий-фосфатным буфером, после чего производят иммуноцитохимическую окраску. Инкубируют препарат-цитоспин с 30 мкл первичных антителами GD-2 (клон 14.G2a) в разведении 1/100 в 1 % БСА/ФСБ в течение 30 мин при 37 °С, затем его промывают дважды фосфатно-солевым буфером по 5 мин, прокрашивают вторичными кроличьими анти-мышинными антителами в разведении 1/20 в 1 % БСА/ФСБ и выдерживают в термостате 30 мин при 37 °С. Процедуру промывки, описанную выше, повторяют. Далее препарат инкубируют 30 мин с 30 мкл АРААР комплекса в разведении 1/20 в 1 % БСА/ФСБ. Повторяют процедуру промывки. Для окраски используют систему фуксин-субстрат-хромоген, рабочий раствор которого готовят перед самым окрашиванием. Выдерживают препарат с красителем 10 мин при комнатной температуре. Промывают цитоспин 5 мин под проточной водой. Для контрастирования ядер производят окрашивание гематоксилином (согласно инструкции по применению красителя), в результате ядра приобретают голубой цвет. Для просмотра препарата наносят монтирующую жидкость, содержащую глицерин. Микроскопию проводят под покровным стеклом.

В качестве контроля используют нейробластомную клеточную линию IMR32. При окраске клеток этой линии с использованием первичных анти-GD2-антител во всех клетках наблюдается специфическое красное (положительное) окрашивание. При использовании первичных мышинных античеловеческих IgG2-антител (отрицательный контроль) клетки данной линии окрашиваются в голубой цвет.

Для оценки полученных результатов используют следующие морфологические критерии:

клетки с круглыми ядрами, с зернистой структурой и небольшим количеством цитоплазмы расцениваются как положительные;

клетки с незначительным показателем соотношения размеров ядра и цитоплазмы или имеющие типичные морфологические признаки кроветворных клеток расцениваются как отрицательные.

Для оценки результатов также применяются иммуноцитологические критерии:

клетки с выраженной красной окраской клеточной мембраны и цитоплазмы расцениваются как положительные. При этом слабая окраска неравномерная окраска расценивается как отрицательная.

Основываясь на морфологических и иммуноцитологических критериях, клетки можно разделить на две группы:

положительные: клетки, отвечающие полностью всем вышеперечисленным критериям;

отрицательные: клетки, исключаящие все критерии.

Также производят количественную оценку образца. Учитывают количество положительных клеток на 500 тыс. клеток (общее число клеток в одном цитоспине). Группы положительных клеток оцениваются отдельно, причем устанавливается примерное число клеток в каждой такой группе. Чувствительность метода  $10^{-4}$ .



## **Алгоритм оценки «поражения» костного мозга у пациентов с нейробластомой**

Если уровень опухолевых клеток исследованных всеми тремя методами позитивен, т. е. выше порога чувствительности, не менее, чем в двух методах, то костный мозг считается «поражен».

Если уровень опухолевых клеток исследован всеми тремя методами, и выше порога чувствительности, только одним методом, то такие данные считаются не корректными. В данном случае необходимо повторное исследование всеми доступными методами.

Необходимо исследование как минимум двумя методами, для исключения как ложноположительных так и ложноотрицательных результатов.

### **Определение остаточных опухолевых клеток в костном мозге на этапах терапии**

На этапах терапии остаточные опухолевые клетки также оцениваются теми же методами полуколичественной ПЦР в реальном времени, проточной цитометрии и иммуноцитохимии.

Алгоритм оценки «поражения» костного мозга оценивается аналогичным образом как описано ранее.

Этими же методами оценивается уровень опухолевых клеток при лечении рецидива заболевания.