

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ  
Первый заместитель министра

\_\_\_\_\_ Р.А. Часнойть  
3 октября 2008 г.  
Регистрационный № 083-0808

**ОБОГАЩЕНИЕ ПОПУЛЯЦИИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК  
И РАЗДЕЛЕНИЕ ГЕТЕРОГЕННЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ ДЛЯ  
ПОСЛЕДУЮЩЕГО МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА,  
ИССЛЕДОВАНИЯ АПОПТОЗА И ПРОЛИФЕРАЦИИ ПРИ ОСТРЫХ  
ЛЕЙКОЗАХ У ДЕТЕЙ**

инструкция по применению

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

АВТОРЫ: канд. биол. наук Т.В. Шман, канд. биол. наук М.В. Белевцев, канд.  
биол. наук А.М. Кустанович, д-р мед. наук, проф. О.В. Алейникова,  
В.П. Савицкий, В.В. Федосенко, Н.В. Липай, Л.В. Мовчан

Минск 2009

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

Термоциклер.  
Термоциклер для проведения ПЦР в реальном времени.  
Центрифуги с охлаждением на 14000 об/мин.  
ПЦР-боксы.  
Аппарат для горизонтального электрофореза в агарозном геле.  
Вакуумный аспиратор.  
Варипипетки (дозаторы).  
Вортекс.  
Документирующая система.  
Камера Горяева.  
Микроскоп.  
Морозильник -20 °С.  
Морозильник -70 °С.  
Проточный цитофлюориметр с сортером клеток.  
Спектрометр.  
Термомиксер.  
Супермикс для количественной ПЦР.  
Тақ-полимераза.  
В-меркаптоэтанол.  
Агароза.  
Вода деионизированная.  
Изопропанол.  
Ингибитор РНКаз  
Маркер молекулярного веса.  
Обратная транскриптаза.  
Растворы дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (дНТФ).  
Рэндом-гексамеры.  
Фенол-хлороформ-изоамиловый спирт (25:24:1).  
Фосфатно-солевой буфер (ФСБ).  
Хлороформ.  
Этанол 70%.  
Этанол 96%.  
TRI-reagent.  
Наконечники для дозаторов с аэрозольными барьерами (объем от 0,1 до 1000 мкл) и пробирки (объем 0,2–50 мл).  
Праймеры и пробы.  
Гистопак или Лимфопреп.  
Среда для промывания.  
Полная среда для культивирования.  
Стерильные флаконы или пробирки для культивирования.  
Стерильные пастеровские пипетки.  
Стерильные пипетки на 5–10 мл.  
Стерильные пипетки на 1 и 5 мл.

Фосфатный буфер I (pH=7,2–7,4).  
Моноклональные антитела.

## **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

За последние десятилетия выживаемость детей с острыми лейкозами значительно улучшилась благодаря внедрению современных методов диагностики и лечения. Однако в 25–30% случаев впоследствии развиваются рецидивы заболевания. Одной из возможных причин их возникновения является сосуществование нескольких опухолевых субпопуляций, различающихся по чувствительности к химиотерапии. Подобные различия в чувствительности лейкемических клеток, принадлежащих к различным субклонам, могут быть связаны с разным уровнем экспрессии генов апоптоза и лекарственной устойчивости, химерных онкогенов, а также особенностями клеточного цикла субпопуляций.

Метод иммунофенотипирования опухолевых клеток является одним из основных при диагностике онкогематологических заболеваний. Анализ совокупной экспрессии поверхностных и внутриклеточных антигенов позволяет определить тип лейкоза и стадию его дифференцировки. В 90% случаев острые лимфобластные и в 70% острые миелодные лейкозы характеризуются aberrантным иммунофенотипом по сравнению с нормальными гемопоэтическими клетками.

Таким образом, важным является возможность разделения гетерогенных популяций лейкозных клеток во время дифференциальной диагностики острых лейкозов у детей.

Во многих диагностических случаях низкое содержание опухолевых клеток в образцах костного мозга (КМ) (периферической крови, ПК) пациентов с острыми лейкозами не позволяет провести полную иммунофенотипическую и адекватную диагностику с использованием молекулярно-биологических и цитогенетических методов. В связи с этим необходимо выполнение предварительного концентрирования (обогащения) опухолевых клеток. Существует ряд методов, применяемых для разделения или обогащения отдельных субпопуляций клеток, находящихся в смешанной суспензии (центрифугирование, прикрепление на пластик, магнитная сепарация и др.). Преимуществом техники, основанной на применении проточной цитофлюориметрии, является возможность количественно анализировать различные свойства клеток в режиме реального времени, что позволяет проводить обогащение или разделение клеток, отличающихся по своим характеристикам. Необходимо отметить, что данный метод обладает одним из самых высоких показателей чистоты сортировки клеток — соответствия свойств выделенной фракции клеток параметрам, заданным в суммарной (смешанной) суспензии.

## **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СПОСОБА**

*Выделение мононуклеарных клеток (МНК)*

Материалом для исследования при лейкозах являются бластные клетки костного мозга или периферической крови (при появлении бластных клеток в ней).

При выраженном бластозе основной фракцией МНК в КМ/ПК будут бласты.

1. КМ и/или ПК развести средой для промывания до объема не более 8 мл.
2. В другую пробирку поместить 4 мл Гистопака.
3. Медленно по стенке пробирки наслоить не более 8 мл разведенного КМ и/или ПК так, чтобы не допустить смешивания с Гистопаком.
4. Центрифугировать 20 мин при 2200 об/мин.
5. Стерильной пастеровской пипеткой осторожно перенести кольцо из МНК в другую пробирку.
6. Отмыть клетки 1–2 раза в 10 мл среды для промывания, центрифугируя по 10 мин при 1500 об/мин. Слить надосадочную жидкость, оставив 1–1,5 мл.
7. Ресуспендировать клетки и подсчитать их концентрацию в камере Горяева.

#### ***Определение иммунофенотипических особенностей лейкемических клеток***

Выделенные лейкемические клетки двукратно отмывали в фосфатно-солевом буфере, осаждая клетки центрифугированием в течение 5 мин при 300g. Затем клетки инкубировали со специфическими моноклональными антителами (МКА) к CD45, CD14, CD8, CD4, CD3, DR, CD20, CD5, CD7, CD13, CD10, CD117, CD19, CD33, CD34, CD22, CD2, CD1a, CD15, CD11c и изотипическим контролем, мечеными FITC, PE и PerCP (Becton Dickinson, USA; Caltag, USA). К образцу (100000–500000 клеток) добавляли 20 мкл МКА и инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 30 мин, затем клетки дважды отмывали в ФСБ центрифугированием в течение 5 мин при 300g. Исследования выполняли на проточном лазерном цитофлуориметре FACScan (Becton Dickinson, BD). Проводили регистрацию прямого светорассеяния (под углом 1–10°), бокового светорассеяния (под углом 90°) и анализ экспрессии CD45 для выделения нормальных и лейкозных клеток. Для каждого образца анализировали не менее 10<sup>4</sup> клеток. Обработка полученных результатов проводилась с использованием статистического пакета цитофлуориметра CellQuestPro.

#### ***Сортировка клеток для разделения гетерогенных субпопуляций опухолевых клеток***

Сортировка клеток с использованием техники проточной цитофлуориметрии позволяет разделить субпопуляции клеток, находящиеся в суспензии, с высокой степенью чистоты (>95%). Полученные фракции клеток могут быть использованы для дальнейших морфологических, молекулярно-биологических или функциональных исследований. Любые

параметры или их комбинации, анализируемые с помощью проточного цитофлюориметра, могут быть использованы в качестве критериев выбора субпопуляций для сортировки. Важным преимуществом сортировки клеток с помощью проточной цитометрии является возможность разделения фракций клеток, близких по морфологическим свойствам, но различающихся по функциональным характеристикам.

Одним из наиболее распространенных методов сортировки клеток на базе проточных цитофлюориметров является метод, основанный на электростатическом отклонении капель буферного раствора, содержащего клетки. Проходя через проточный цитофлюориметр, буфер, содержащий клеточную суспензию, подвергали воздействию вибрации для создания упорядоченного потока однородных капель. При сортировке калибровочных частиц и лейкоцитарных клеток использовали керамический наконечник диаметром 70 мкм. Определяли расстояние и время отрыва первой капли в потоке. С использованием электрического импульса создавали заряд капель. Заряженные капли, проходя через пластины, в зависимости от полярности заряда отклонялись в пробирки системы сбора клеток. Изменяя значения амплитуды и частоты вибрации наконечника, добивались минимального расстояния между точкой пересечения потока буфера с лазерным лучом. Наилучшие результаты были получены при амплитуде около 3 В и частоте от 22 до 28 кГц. Давление проточного раствора устанавливали от 10 до 11 psi. Давление системы подачи образца устанавливали в зависимости от концентрации клеток в суспензии таким образом, чтобы скорость анализа и сортировки была  $3000 \pm 100$  клеток в 1 с (но не более 10 psi). Для сбора клеток после их сортировки использовали пробирки объемом 15 мл.

### ***Обогащение популяции лейкоцитарных клеток***

Метод обогащения клеток с помощью проточной цитофлюориметрии обладает одним из самых высоких показателей чистоты сортировки клеток — соответствия свойств выделенной фракции клеток параметрам, заданным в суммарной (смешанной) суспензии.

Известно, что лейкоцитарные клетки отличаются от своих нормальных аналогов по ряду характеристик, включая структурно-морфологические свойства, экспрессию поверхностных и внутриклеточных антигенов и др. С использованием методов, основанных на применении техники многопараметрической проточной цитофлюориметрии, мы проводили идентификацию лейкоцитарных клеток с целью их последующего обогащения.

Для этого применяли технику, основанную на капельном принципе сортировки. В поток буферного раствора вводили образец, содержащий суспензию клеток. Следующим этапом являлось прохождение клеток в потоке через лазерный луч. При этом проводили регистрацию и анализ параметров светорассеяния и флуоресценции клеток.

Во избежание снижения чистоты обогащенной фракции клеток применялись следующие методологические приемы. Для сортировки клеток

использовались несколько вариантов керамических наконечников проточной ячейки различного размера, учитывая при этом клеточные характеристики. Для обогащения лейкоэмических клеток использовались керамические наконечники, превышающие размер клеток в 7–10 раз, что позволяло исключить закупоривание наконечника клетками. Для предотвращения прерывания процесса сортировки клеток проводили также предварительное фильтрование суспензии клеток с использованием фильтров ВД.

После прохождения зоны анализа капли потока, содержащие клетки, выбранные для обогащения, получали электрический заряд. Затем, используя вибрацию керамического наконечника, получали упорядоченный поток капель, содержащий как лейкоэмические клетки, так и примесь нормальных клеток, а также клеточные конгломераты и обломки клеток.

При прохождении капель (с клетками) через заряженные отклоняющие пластины осуществляли электростатическое отделение в боковой поток капель, содержащих лейкоэмические клетки, выбранные для обогащения, и направляли их в пробирку для сбора клеток. В отличие от метода разделения субпопуляций лейкоэмических клеток формирование второго бокового потока не проводили, а капли, содержащие примесь нормальных клеток, не отклоняя, направляли в резервуар для отходов.

На протяжении всего процесса обогащения лейкоэмических клеток осуществляли контроль скорости потока суспензии клеток. С этой целью при постоянном давлении воздуха в системе подачи проточного буфера (10–11 psi) регулировали уровень давления воздуха в системе подачи образца (от 1 до 10 psi). Для получения относительно высокой скорости анализа и сортировки клеток проводили предварительное концентрирование образца клеток (до  $10^7$  млн).

Как отмечалось ранее, одним из наиболее критических параметров, определяющим эффективность сортировки методом проточной цитофлюориметрии, является время прохождения капли между точкой пересечения потока жидкости, содержащей суспензию клеток с источником возбуждения (лазерным лучом), и точкой образования капель (drop delay). Для более точной калибровки данного параметра использовалась система AccuDrop и специализированные флюоресцентные частицы (ВД). Для возбуждения флюоресценции калибровочных частиц использовали дополнительный диодный лазер. Детекцию флюоресцентного сигнала выполняли с использованием дополнительной видеокамеры со сниженной областью наблюдения, эмиссионного фильтра, установленного на видеокамере, и дополнительного монитора, позволяющего одновременно анализировать центральный поток в области образования капель и боковые потоки. Настройку диодного лазера проводили, вращая микрометр диодного лазера вправо и влево, добиваясь равномерной освещенности центрального и боковых потоков жидкости.

Сбор обогащенной фракции клеток осуществляли в пробирки объемом 15 мл, что позволило проводить сортировку клеток непрерывно в течение продолжительного времени (более 2 ч). В пробирки перед проведением

процедуры обогащения добавляли ЭТС, что способствовало предотвращению прилипания клеток к стенкам пробирки. Важным моментом является выбор материала пробирок для сбора клеток. Капли отклоняемых потоков несут электрический заряд, то при использовании пластиковых пробирок при сборе клеток возможны существенные потери клеток обогащенной фракции. Данный фактор, негативно влияющий на эффективность обогащения, был исключен при использовании стеклянных пробирок для сбора клеток.

#### ***Определение апоптоза в субпопуляциях лейкемических клеток***

Для оценки способности к спонтанному апоптозу лейкемических клеток различных субпопуляций сортированные клетки культивировали в среде RPMI-1640, содержащей сыворотку, в течение 20 ч при 37 °С во влажной атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Для анализа лекарственно-индуцированного апоптоза в среду добавляли различные концентрации химиопрепаратов. Апоптотические клетки выявляли после окрашивания флуоресцентным зондом, специфическим к митохондриям хлорометил X-розамин, методом проточной цитофлуориметрии (CMXRos, Molecular Probes).

#### ***Определение лекарственной чувствительности лейкемических клеток, обогащенных из смеси клеток, методом проточной цитофлуориметрии***

После получения обогащенной популяции лейкемических клеток проводили двукратную отмывку клеток в среде RPMI-1640, после чего клетки переводили в среду, содержащую 15–20% сыворотки в концентрации 2 млн/мл. Полученную суспензию клеток раскапывали в 96-луночный планшет, содержащий различные концентрации исследуемых химиопрепаратов (опыт) и физиологический раствор (контроль). Проводили культивирование при 37 °С во влажной атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в течение 20 ч для образцов, полученных от пациентов с ОЛЛ, и 40 ч — с ОМЛ. Количество погибших клеток определяли по накоплению пропидиума иодида (PI) или по окрашиванию с помощью CMXRos методом проточной цитофлуориметрии.

#### ***Анализ клеточного цикла в субпопуляциях лейкемических клеток***

Полученные после сортировки лейкемические клетки различных субпопуляций отмывали в ФСБ и фиксировали охлажденным 70% этанолом. Фиксированные клетки дважды отмывали, обрабатывали РНКазой (150 ед./мл) и окрашивали раствором PI (50 мкг/мл) в течение 30 мин. Окрашенные образцы анализировали на проточном цитофлуориметре FACScan.

#### ***Выделение суммарной РНК***

Для инактивации экзогенных РНКаз все растворы, использовавшиеся при выделении РНК, были приготовлены с применением деионизированной

воды, обработанной диэтилпиракарбонатом (ДЭПК). Через 16 ч после добавления ДЭПК (до концентрации 0,1%) воду автоклавировали.

Осадок, содержащий  $5-10 \times 10^6$  клеток (количество клеток определяли в камере Горяева с использованием 10% уксусной кислоты), лизировали в 1 мл TRI-reagent. Лизат оставляли на 5 мин при комнатной температуре для полной диссоциации нуклеопротеиновых комплексов, после чего его либо замораживали при  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ , либо использовали непосредственно для экстракции РНК. Затем РНК выделяли с использованием набора Tri-Reagent в соответствии с инструкциями производителя.

Качество и количество РНК оценивали спектрофотометрически и электрофоретически. Спектрофотометрическое определение проводили в соответствии с инструкциями производителя. При этом оценивали примесь белков по соотношению поглощения ультрафиолетового света с длиной волны 260 (для нуклеиновых кислот) и 280 нм (для белков) (260/280) и примесь углеводов по соотношению 260/230 нм. Образец суммарной РНК считали чистым при значении показателей более 1,8. Количественное определение концентрации РНК проводилось спектрометром автоматически путем умножения значения поглощения света при 260 нм на коэффициент 40. Качество РНК оценивали также визуально после электрофореза 5 мкл РНК в 1,5% агарозном геле, окрашенном бромистым этидиумом. В случае качественной РНК флюоресценция в начале (примесь ДНК) и конце (деградированная РНК) дорожки отсутствовала, а интенсивность полосы 18S рибосомальной РНК была примерно в два раза выше, чем полосы 16S рРНК.

### ***Стандартизированный протокол группы ЕАС для обратной транскрипции и количественной ПЦР***

Подробный протокол проведения анализа и интерпретация полученных результатов изложены в статье «Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia — a Europe Against Cancer program» / J. Gabert [et al.] // Leukemia. — 2003. — Vol. 17. — P. 2318–2357.

#### ***Обратная транскрипция***

1 мкг тотальной РНК в 10 мкл  $\text{H}_2\text{O}$  инкубировать 10 мин при  $70\text{ }^\circ\text{C}$ . Охладить и добавить остальные реагенты до конечного объема 20 мкл: 100 единиц обратной транскриптазы, буфер для обратной транскрипции, дНТФ (1 мМ), ДТТ (10 мМ), рэндом гексамеры (25 мМ), ингибитор РНКаз (20 единиц).

Инкубировать последовательно 10 мин при комнатной температуре, при  $42\text{ }^\circ\text{C}$  — 45 мин, при  $99\text{ }^\circ\text{C}$  — 3 мин. Поместить образец на  $4\text{ }^\circ\text{C}$ . В полученную кДНК добавить 30 мкл  $\text{H}_2\text{O}$ .

#### ***Анализ уровня экспрессии химерных онкогенов с помощью количественной ПЦР***



Для проведения ПЦР в реальном времени использовали коммерческие наборы, содержащие реакционную смесь для проведения ПЦР с TaqMan пробой (Invitrogen, США) и рекомендованные Программой «Специфические праймеры и пробы» (Синтол, Россия). Реакцию проводили на амплификаторе iCycler (Bio-Rad, США). Для определения количества копий химерных (*TEL-AML1*) и контрольного гена *GUS* использовали ДНК-стандарты (Ipsogen, Франция), представляющие собой 10-кратные разведения плазмидной ДНК от  $10^6$  до  $10^1$  копий со встроенным участком исследуемого гена. Определение количества копий в образцах проводили с помощью программы для амплификатора iCycler, что включало в себя построение стандартных калибровочных кривых для химерного и нормального генов и абсолютное определение количества копий этих генов в исследуемых образцах. Для каждого пациента количество химерного транскрипта было нормализовано по отношению к количеству нормального гена в этом же образце, то есть исследуемый химерный онкоген/*GUS*. Все образцы были анализированы в дубликатах. Образцы с уровнем экспрессии *GUS*, негативные или имеющие значение менее 1000 копий, исключались из исследования. Позитивные и негативные контроли включали во все исследования.

В конечный объем 25 мкл вносили 5 мкл кДНК (эквивалент 100 нг РНК), праймеры (300 нМ каждого), пробы (200 нМ, 100 нМ пробы в случае *AML1-ETO*), мастер микс (12,5 мкл). Инкубировали 2 мин при 50 °С, 10 мин — при 95 °С. Затем проводили 50 циклов (95 °С — 15 с, 60 °С — 1 мин). Все упомянутые концентрации указаны для конечного объема реакции.

#### ***Анализ уровня экспрессии генов MDR1, LRP и BCRP с помощью относительной количественной ПЦР***

На первом этапе проводили экстракцию тотальной РНК с помощью коммерческого набора для выделения тотальной РНК Gen Elute Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma). Количество и качество выделенной РНК определяли с помощью спектрофотометра Gene Quant RNA/DNA Calculator (GE Healthcare) и электрофореза в агарозном геле. Реакцию обратной транскрипции выполняли немедленно после выделения РНК с помощью набора для синтеза кДНК Advantage RT-for-PCR Kit (BD) согласно протоколу изготовителя. Уровень экспрессии гена определялся методом относительной количественной ПЦР в режиме реального времени (iCycler, BioRad) с использованием клеточной линии IM-9 в качестве контроля и калибратора. Для нормализации количества кДНК, вносимой в реакцию, использовался нормальный ген *GUS*. Для расчета относительного количества РНК исследуемого гена применялся метод стандартных разведений. Стандартные кривые для исследуемого и нормального гена в каждой реакции строились по четырем 10-кратным разведениям кДНК, выделенной из клеточной линии IM9. Амплификация проводилась в конечном объеме реакционной смеси (25 мкл), содержащем кДНК, Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG (Invitrogene, конечная концентрация  $MgCl_2$  была повышена до 4 мМ),

300 нМ каждого из праймеров и 200 нМ TaqMan пробы. В работе были использованы следующие праймеры и пробы:

**MDR1** прямой праймер: AGG AAG ACA TGA CCA GGT ATG C;  
обратный праймер: CCA ACA TCG TGC ACA TCA AAC;  
TaqMan проба: FAM CCT GGC AGC TGG AAG ACA AAT ACA  
CAA BHQ1;

**LRP** прямой праймер: CAG CTG GCC ATC GAG ATC A;  
обратный праймер: TCC AGT CTC TGA GCC TCA TGC;  
TaqMan проба: FAM CAA CTC CCA GGA AGC GGC GGC  
BHQ1;

**BCRP** прямой праймер: TGG CTG TCA TGG CTT CAG TA;  
обратный праймер: GCC ACG TGA TTC TTC CAC AA;  
TaqMan проба: FAM AGC AGG GCA TCG AGC TCT CAC CCT  
G BHQ1;

**TaqMan** проба: FAM AGC GTG CGC CAT CCT TCC CAG BHQ1.

Последовательности праймеров и пробы для нормального гена GUS разработаны и рекомендованы для использования при нормализации количества кДНК в рамках программы «Европа против рака» и изложены в статье «Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia — a Europe Against Cancer program» / J. Gabert [et al.] // Leukemia. — 2003. — Vol. 17. — P. 2318–2357.