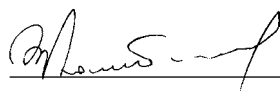


**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра



В.В. Колбанов

13 февраля 2003 г.

Регистрационный № 111–1102

**ПРИМЕНЕНИЕ МТТ-ТЕСТА ДЛЯ ОЦЕНКИ
ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ЛЕЙКОЗНЫХ
КЛЕТОК К ЦИТОСТАТИЧЕСКИМ
ПРЕПАРАТАМ *IN VITRO* И
ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ОТВЕТА
НА ХИМИОТЕРАПИЮ ПРИ ЛЕЙКОЗАХ**

Инструкция по применению

Учреждения-разработчики: НИИ гематологии и переливания крови, Республиканский центр гематологии и трансплантации костного мозга, 9-я городская клиническая больница г. Минска

Авторы: П.Б. Мицкевич, С.М. Космачева, Ж.А. Ибрагимова, Т.В. Шман, В.Ф. Мыслицкий

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Острые и хронические лейкозы у взрослых и детей, требующие проведения специфической химиотерапии.

Общие принципы МТТ-метода

Противоопухолевое действие цитостатических химиопрепаратов на лейкозные клетки может быть определено *in vitro* с помощью МТТ-метода (теста). С этой целью лейкозные клетки инкубируются в отсутствие (контроль) или в присутствии различных концентраций исследуемых цитостатических препаратов. После 48 ч культивирования клеток и исследуемых препаратов в питательной среде при 37° С во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂, в каждую лунку добавляется 3-[4,5-диметилтиазолил-2-ел]-2,5-дифенилтетразолиум бромид (МТТ). Через 4 ч экспозиции при 37° С живые клетки восстанавливают желтый МТТ до темно-фиолетовых гранул формазана. Гранулы формазана растворяются в изопропанол или диметилсульфоксиде (ДМСО), количество восстановленного продукта измеряется фотометрически при длине волны 540 нм. Выживаемость лейкозных клеток в присутствии исследуемого лекарственного препарата рассчитывается по формуле:

$$(\text{ОП опытных лунок} - \text{ОП среды} / \text{ОП контр. лунок} - \text{ОП среды}) \times 100\%$$

где ОП — оптическая плотность.

Концентрация препарата, которая вызывает 50% гибель клеток (LC50), может быть рассчитана графически по дозозависимой кривой. Для вычисления LC50 используют также специальную компьютерную программу, составленную в Excel (Veerman A.G.P., 1999; Kaspers G.J.L., 1999).

Критерии отбора образцов лейкозных клеток больных

1. Проведение МТТ-теста считается целесообразным, только если исследуемые клетки отвечают следующим критериям:

- образец выделенных мононуклеарных клеток содержит не менее 60% лейкозных клеток;
 - соотношение лейкоцитов с эритроцитами >2:1.
2. Учет МТТ-теста считается целесообразным, если:
- жизнеспособность клеток в контрольных лунках на 3-й день культивирования составляет не менее 70%;
 - ОП контрольных лунок не менее 0,05 единиц (шкала 0,0–1,0).

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ И РЕАКТИВОВ

Оборудование

1. Камера пылезащитная не ниже II класса с ламинарным потоком стерильного воздуха).
2. Центрифуга (1200–1500–1800 об./мин).
3. CO₂ -инкубатор.
4. Многоканальный или одноканальный планшеточный спектрофотометр (540 нм и 720 нм).
5. Набор автоматических дозаторов.
6. 96-луночные круглодонные планшеты для культур клеток.

Реактивы

1. Фиколл-верографин, 1,077 г/см³.
2. Среда RPMI-1640.
3. Пенициллин-стрептомицин (в конечной концентрации 100 ЕД/мл).
4. Раствор L-глутамина в конечной концентрации 2,5 ммоль).
5. Термоинактивированные (56° С, 30 мин) АВ-сыворотка или эмбриональная телячья сыворотка.
6. Изотонический фосфатно-солевой буфер (рН 7,2).
7. МТТ (Sigma).
8. ДМСО, 100%, безводный.
9. Изопропанол.
10. Тестируемые цитостатические препараты.

ТЕХНОЛОГИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Приготовление культуральной среды и реагентов

Культуральная среда (полная питательная среда (ППС)): RPMI-1640, 2 ммоль L-глутамина, 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мг/мл стрептомицина, 10% АВ (IV)-сыворотки или ЭТС.

МТТ: растворить 10 мг МТТ в 2 мл 0,9% NaCl. Поместить в термостат на 15–20 мин. Стерилизовать раствор через фильтр с диаметром пор 0,22 мм. Хранить при –20° С, расфасовав по аликвотам.

10-кратный раствор NaCl (1,5 моль): растворить 8,775 г NaCl (х.ч.) в 100 мл бидистиллированной воды. Стерилизовать раствор через фильтр с диаметром пор 0,22 мм.

Раствор А для лизиса эритроцитов: 1,55 моль NH₄Cl и ммоль Na₂ ЭДТА в стерильной воде. Растворить 8,29 г NH₄Cl и 0,037 г Na₂ ЭДТА в 100 мл стерильной дистиллированной воды. Хранить при +4° С.

Раствор В для лизиса эритроцитов: 0,1 моль KНСО₃ в стерильной дистиллированной воде. Растворить 1,0 г

0,1 моль KHCO_3 в 100 мл стерильной дистиллированной воды. Хранить при $+4^\circ \text{C}$.

Закисленный изопропанол: 2-пропанол с 0,04 Н HCl . Добавить 1 мл 2 Н HCl к 50 мл 2-пропанола. Готовить закисленный изопропанол не позднее чем за 2 недели до использования. Хранить при комнатной температуре.

Забор, выделение и очистка лейкозных клеток

Забор лейкозных образцов

Образцы костного мозга (КМ) или периферической крови (ПК), свежие или взятые в течение 24 ч, могут быть использованы при содержании в них лейкозных клеток на момент забора не менее 60%. КМ и ПК берутся в пробирки с расчетным конечным содержанием гепарина 20 ЕД/мл КМ или ПК. Пробирки транспортируются в лабораторию при комнатной температуре.

Выделение лейкозных клеток

1. Подсчитать количество лейкоцитов в образцах.
2. Развести образцы КМ или ПК средой RPMI-1640 в соотношении 1:1.
3. Наслоить 4–6 мл клеточной суспензии на 3 мл лимфопрепа ($D = 1,078 \text{ г/см}^3$) с максимальным содержанием клеток 100×10^6 .
4. Центрифугировать при 1800 об./мин в течение 20 мин (свежий материал) или 1500 об./мин в течение 15 мин (24-часовой материал) при комнатной температуре.
5. Удалить верхний слой без нарушения интерфазы.
6. Собрать интерфазу и часть лимфопрепа в отдельную пробирку.
7. Добавить среду RPMI-1640 с 1% АВ (IV) сыворотки или 1% ЭТС.
8. Центрифугировать при 1800 об./мин в течение 10 мин при комнатной температуре.
9. Ресуспендировать клетки в RPMI-1640 с 1% АВ (IV) сыворотки или 1% ЭТС.
10. Центрифугировать при 1200 об./мин в течение 10 мин при комнатной температуре.
11. Ресуспендировать клетки в культуральной среде в концентрации 50–100 $\times 10^6$ клеток/мл.

Установление содержания лейкозных клеток в каждом образце

Установить процент лейкозных клеток можно по морфологии клеток, окрашенных по методу Романовского — Гимзы:

- приготовить мазки клеток на предметных стеклах;
- фиксировать 100% метанолом в течение 3 мин при комнатной температуре;
- окрасить в течение 10–15 мин краской Романовского — Гимзы;
- смыть стекла под водопроводной водой;
- высушить стекла;
- изучить морфологию клеток и подсчитать процент лейкозных клеток (бластов) под световым микроскопом.

Выделение обогащенной фракции бластных клеток методом сепарации на градиенте плотности перколла

Если относительное содержание бластных (лейкозных) клеток во фракции мононуклеаров (после разделения на лимфопрепе) менее 60%, то для более точной оценки химиочувствительности лейкозных клеток рекомендуется провести их обогащение на ступенчатом градиенте плотности перколла.

1. Приготовление исходного изо-осмолярного (изотонического) раствора перколла:

- приготовить 10х раствор NaCl (1,5 моль);
- смешать 9 частей (90 мл) фирменного раствора перколла с 10 мл 1,5 моль раствора NaCl .

Плотность полученного раствора равна $1,123 \text{ г/см}^3$ (при исходной $d = 1,130 \text{ г/см}^3$). Хранить при $+2$ – $+8^\circ \text{C}$ в течение 6 мес.

2. Приготовление ступенчатого градиента плотности перколла

№ раствора	Плотность, г/см^3	Перколл (изотонический), мл	RPMI-1640, мл
1	1,077	3,00	1,90
2	1,060	3,00	2,60
3	1,050	3,00	3,00

Формула для расчета:

$$V_{\text{RPMI}} = V_{\text{Percoll}} \times [(d_{\text{перколл исх.}} - d_{\text{необход.}}) / (d_{\text{необход.}} - d_{\text{RPMI}})]$$

Фракционирование клеток

1. Приготовить суспензию клеток для разделения (2 мл, количество клеток — от 10 до 100 млн).
2. С помощью шприца или пастеровской пипетки в центрифужную пробирку осторожно наслоить по 3 мл разведенного раствора перколла в следующей последовательности: № 1 (1,077) снизу, затем № 2, сверху — № 3.

3. На раствор перколлы № 3 осторожно наслоить 2 мл взвеси клеток.
4. Центрифугировать при 400 g в течение 20 мин при комнатной температуре.
5. Отобрать полученные фракции клеток.
6. Отмыть 2 раза средой RPMI + 5% ЭТС.
7. Подсчитать клетки с 0,2% трипановым синим.
8. Приготовить из каждой фракции клеток цитоцентрифужные препараты (по 25 тыс. клеток на одно стекло; 50 тыс. клеток ресуспендировать в 200 мкл RPMI + 5% ЭТС; в центрифугу вносить по 100 мкл на одно стекло).
9. Высушить препараты, зафиксировать и окрасить по Нохту или по Романовскому. Посчитать процент бластных клеток.
10. Выбрать фракции с наибольшим процентом бластных клеток и тестировать на чувствительность к цитостатическим препаратам.

Жизнеспособность клеток и количество лейкоцитов и эритроцитов в лейкозных образцах

1. Жизнеспособность лейкозных клеток, количество лейкоцитов и эритроцитов оценивается по исключению трипанового синего.
2. Смешать аликвоту клеток с равным объемом 0,2% раствора трипанового синего. Подсчитать количество неокрашенных (живые клетки), синих (мертвые клетки) и желтоватых клеток (эритроциты).
3. Подсчитать процент жизнеспособности, клеточную концентрацию и соотношение лейкоциты/эритроциты.
Раствор трипанового синего для окрашивания: приготовить 0,2% трипановый синий на PBS с добавлением 0,1% азида натрия и профильтровать. Хранить при комнатной температуре.

Удаление эритроцитов

Эритроциты могут влиять на переход МТТ в формазан на 3-й день МТТ-теста. Поэтому эритроциты должны быть удалены до культивирования лейкозных клеток. Лизис эритроцитов проводят, если соотношение лейкоцитов к эритроцитам больше 2:1.

1. Добавить к 8 мл стерильной воды 1 мл раствора А и 1 мл раствора В для лизиса эритроцитов.
2. Фильтровать раствор через 0,22 мм фильтр.
3. Добавить 5% ЭТС и охладить лизирующий раствор на льду.
4. Добавить 2–5 мл раствора к клеткам.
5. Инкубировать на льду в течение 5 мин.
6. Добавить среду RPMI-1640 через 5 мин.
7. Отобрать 30 мкл суспензии клеток для подсчета количества.
8. Центрифугировать оставшиеся клетки при 1200 об./мин в течение 10 мин при комнатной температуре.
9. Смешать 20 мкл ранее отобранной суспензии клеток с трипановым синим (1:1) и подсчитать соотношение лейкоцитов и эритроцитов под световым микроскопом. Если соотношение больше 2:1, повторить лизис.

Постановка МТТ-теста

День 1-й:

1. Ресуспендировать клетки в культуральной среде в концентрации $2-4 \times 10^6$ кл/мл.
2. Добавить 100 мкл клеточной суспензии в каждую лунку, кроме контрольных.
3. Добавить 100 мкл культуральной среды в лунки, используемые для «бланкирования» (обнуления фотометра).
4. Заполнить крайние лунки 96-луночной планшеты по 100 мкл среды.
5. Инкубировать 48 ч во влажной атмосфере с содержанием 5% CO₂ при 37° С.

День 3-й:

1. Использовать 2 контрольные лунки для подсчета клеток (окрашивание трипановым синим) и процента лейкозных клеток. Если на 3-й день количество жизнеспособных клеток более 70% , необходимо добавить по 10 мкл МТТ (5 мг/мл) в каждую лунку.
2. Перемешать содержимое лунок планшет на шейкере в течение 5 мин.
3. Инкубировать планшет 4 ч при 37° С и 5% CO₂.
4. Осторожно удалить супернатант, не затрагивая кристаллы формазана.
5. Растворить кристаллы формазана в 100 мкл закисленного (0,04 Н НСl) изопропанола или 150 мкл ДМСО. Ресуспендировать клетки многоканальной пипеткой, пока все кристаллы не растворятся.
6. Инкубировать планшет в течение 5 мин при комнатной температуре.
7. Измерить ОП при длине волны 540 нм (при длине волны сравнения 720 нм).
8. Провести визуальный контроль непосредственно после считывания результатов на наличие факторов, которые могут влиять на оптическую плотность каждой лунки (пузырьки воздуха, белковые преципитаты, царапины на внешней поверхности лунок и т.д.).
9. Провести расчет выживаемости лейкозных клеток и LC50, если ОП превышает 0,05 ед. (по шкале 0,0–1,0).

10. Рассчитать выживаемость лейкозных клеток для каждой концентрации лекарственного препарата.

11. Рассчитать LC50.

Подготовка 96-луночных планшетов с цитостатиками

Большинство цитостатиков хранится как исходный раствор при -20°C один год. Серийные разведения препаратов в RPMI-1640 (без ЭТС), приготовленные из исходного раствора, являются 5-кратным концентратом по сравнению с конечной концентрацией, используемой в клеточной культуре.

1. Добавить 25 мкл 5-кратного концентрата препарата в 2 лунки 96-луночного круглодонного планшета. Не использовать внешние лунки (ряд А и Н, 1-й и 12-й столбцы) из-за испарения среды в течение 3 дней культивирования.

2. В МТТ-тесте в каждом планшете 2-й столбец использовать как контроль среды, который далее считывается фотометром как бланк (только среда), и 3-й столбец как контроль клеток (клеточная культура без лекарственных препаратов) (см. рис.).

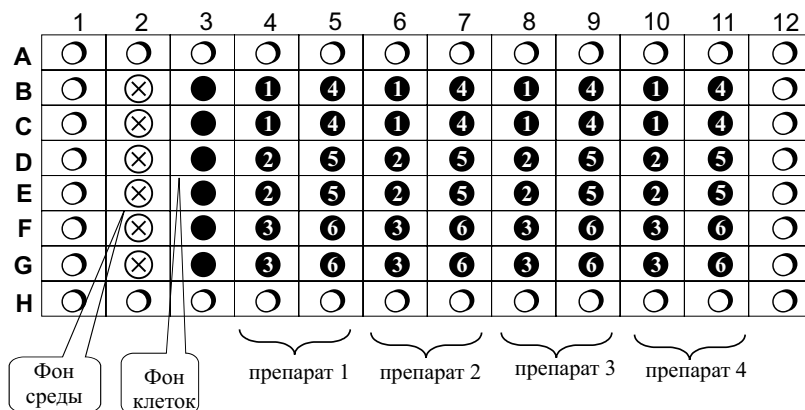


Рис. Схема добавления исследуемых препаратов и клеток в 96-луночную планшету. Цифрами 1, 2, 3 и т.д. указаны лунки, содержащие различные концентрации тестируемого химиопрепарата (в дуплетах).

Краевые лунки не используются для тестов и заполняются стерильной питательной средой для уменьшения испарения из тест-лунок

3. Высокие концентрации некоторых лекарственных препаратов (6-меркап-топурин и 6-тиогуанин) требуют blankирования препаратов без клеток.

Разведения препаратов готовят из исходных разведений непосредственно перед тестированием или заранее (герметично закрытые планшеты с разведенными препаратами могут храниться несколько месяцев при -20°C).

В зависимости от типа опухолевых клеток определяют набор тестируемых химиопрепаратов (табл. 1). Перечень может быть изменен для конкретных протоколов лечения.

Таблица 1

Перечень химиопрепаратов для тестирования на лейкозных клетках, их концентрации и приготовление разведений

№	Препарат	Максимальная концентрация в культуре, мкг/мл	Диапазон исследуемых концентраций, мкг/мл	Концентрация исходного раствора (для хранения)	Разведение исходного раствора для получения рабочего раствора, раз	Концентрация рабочего раствора (10x) (для внесения в культуру)	Приготовление рабочего раствора			
							1-е разведение		окончательное разведение	
							раз	препарат + среда, мкл	раз	препарат + среда, мкл
1	L-аспарагиназа	10	0,03–10	2000	20	100	20	10 + 190		
2	Вепезид	20	0,006–20							
3	Винкристин	1	0,0003–1	10	не разводить!	10		не разводить!		
4	Доксорубицин	0,8	0,0003–0,8	2000	250	8	25	не разводить		
5	Метотрексат	500	0,16–500	5000	не разводить	5000		не разводить!		
6	Митоксантрон	0,4	0,00015–0,4	2000	500	4	50	10 + 490	10	20 + 180
7	Преднизолон	100	0,03–100	25000	25	1000	25	не разводить		
8	Циклофосфан	100	0,03–100	20000	20	1000	20	20 + 380		
9	Цитозар (цитарабин)	200	0,06–200	10000	5	2000	5	50 + 200		

Заморозка лейкозных клеток

1. Подсчитать концентрацию клеток после выделения (кл/мл).
2. Ресуспендировать клетки до 10–100 млн кл/мл в культуральной среде.
3. Поместить клеточную суспензию на лед на 10 мин.
4. Охладить культуральную среду на льду в течение 10 мин.
5. Охладить пробирки для замораживания при -20°C в течение 10 мин.
6. Приготовить замораживающую смесь (культуральная среда, содержащая 20% ЭТС и 20% ДМСО).
7. Охладить замораживающую среду на льду в течение как минимум 10 мин.
8. Добавить по каплям равный объем замораживающей смеси к охлажденной клеточной суспензии при постоянном осторожном перемешивании.
9. Быстро перенести клеточную суспензию в охлажденные пробирки для замораживания.
10. Быстро перенести пробирки в контейнер для замораживания.
11. Контейнер поместить в пары азота на ночь, а утром опустить в азот.

Разморозка лейкозных клеток

1. Прогреть RPMI с 20% ЭТС на водяной бане при 37°C .
2. Перенести пробирки из азота на водяную баню при 37°C .
3. Оттаивать клетки при осторожном перемешивании, пока не останутся только маленькие кусочки льда в пробирке.
4. Обработать пробирки спиртом, прежде чем открыть их в ламинарном боксе.
5. Перенести оттаявшие клетки в подогретую ($+37^{\circ}\text{C}$) среду RPMI-1640, содержащую 20% ЭТС.
6. Центрифугировать клетки при 1500 об./мин в течение 10 мин при комнатной температуре.
7. Ресуспендировать и отмыть клетки в прогретой среде, содержащей 10% ЭТС.
8. Центрифугировать клетки при 1500 об./мин в течение 10 мин при комнатной температуре.
9. Ресуспендировать клетки в культуральной среде.
10. Взять аликвоту для подсчета клеток с трипановым синим и приготовления препаратов для окрашивания.
11. Продолжить очистку образцов, если процент лейкозных клеток недостаточен.

Примечание: опыт нашей работы показал, что использование замороженных клеток возможно, но ограничено индивидуальной чувствительностью лейкозных клеток к замораживанию, поэтому предпочтение необходимо отдавать тестированию свежих образцов лейкозных клеток.

Оценка результатов тестирования

Для сравнения чувствительности лейкозных клеток к действию препаратов, различающихся величиной эффективных концентраций, можно использовать способ балльной (ранговой) оценки результатов МТТ-теста (Астрелина Т.А., 2001). Для этого введено понятие «профиль чувствительности», в соответствии с которым значения LC50 для всех препаратов разделены на 2 группы: высокая чувствительность к действию препарата оценивается баллами 1–4 (включительно); низкая чувствительность — баллами 5–7 (включительно) (табл. 2). Конкретно критерий балльной оценки определяется в каждой лаборатории по результатам тестирования лейкозных клеток не менее 20 больных с одной нозологической формой лейкоза.

Пример балльной оценки чувствительности лейкозных клеток представлен в табл. 3

Таблица 2

Ранговая оценка концентраций цитостатических препаратов, индуцирующих 50% гибель клеток в МТТ-тесте

№	Препарат	Баллы						
		7	6	5	4	3	2	1
1	L-аспарагиназа	> 10	10–2	2–0,4	0,4–0,08	0,08–0,016	0,016–0,003	< 0,003
2	Вепезид	> 20	20–4	4–0,8	0,8–0,16	0,16–0,032	0,032–0,006	< 0,006
3	Винкристин	> 1	1–0,2	0,2–0,04	0,04–0,008	0,008–0,0016	0,0016–0,0003	< 0,0003
4	Доксорубицин	> 0,8	0,8–0,16	0,16–0,032	0,032–0,0064	0,0064–0,0013	0,0013–0,0002	< 0,0002
5	Метотрексат	> 500	500–100	100–20	20–4	4–0,8	0,8–0,16	< 0,16
6	Митоксантрон	> 0,4	0,4–0,08	0,08–0,016	0,016–0,0032	0,0032–0,0006	0,0006–0,00001	< 0,00001
7	Преднизолон	> 100	100–20	20–4	4–0,8	0,8–0,16	0,16–0,032	< 0,032
8	Циклофосфан	> 100	100–20	20–4	4–0,8	0,8–0,16	0,16–0,032	< 0,032
9	Цитарабин	> 200	200–40	40–8	8–1,6	1,6–0,32	0,32–0,064	< 0,064

Примечание: концентрация препаратов, вызывающих 50% гибель клеток (LC50), приведена в мкг/мл.

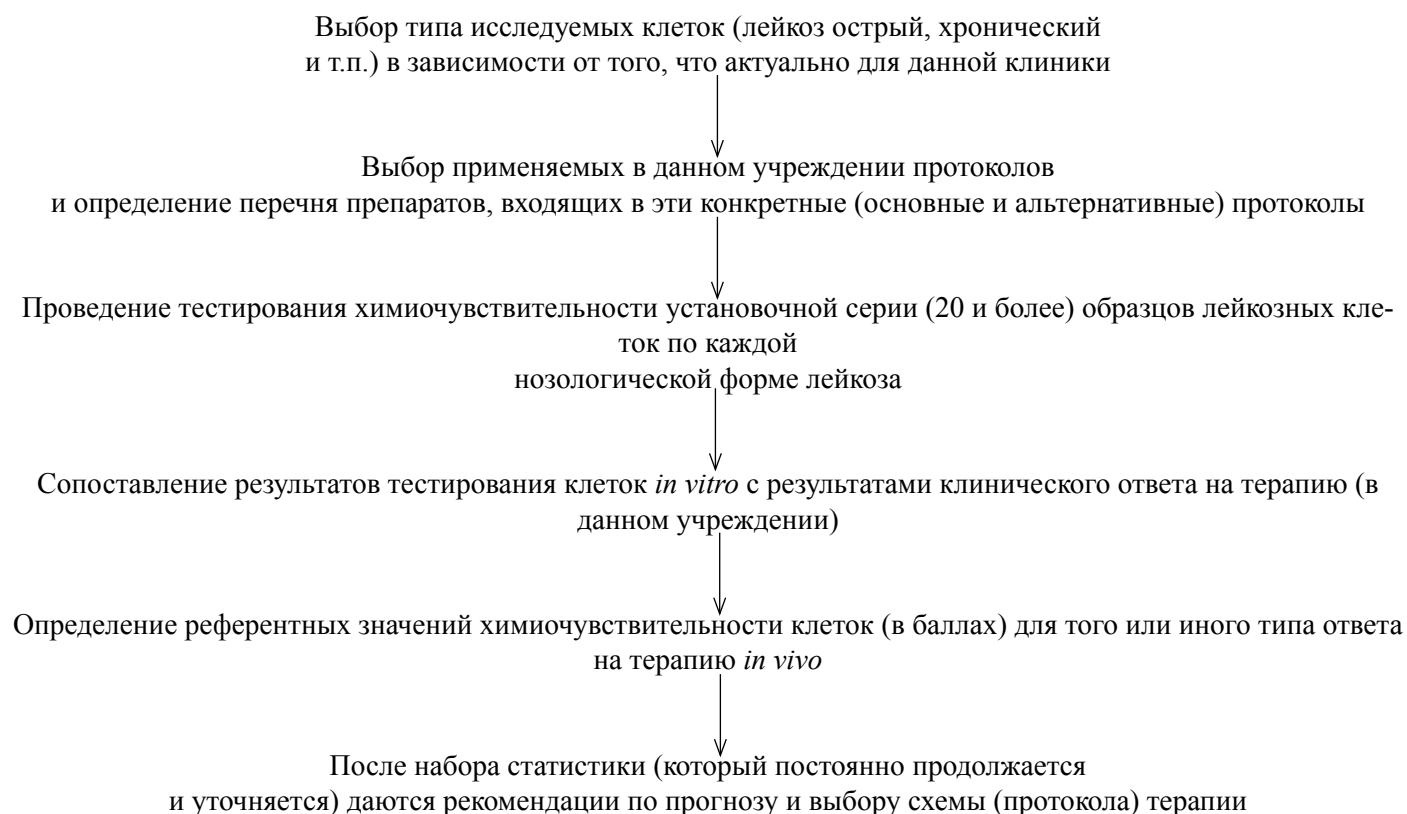
Пример балльной оценки чувствительности лейкозных клеток больных ОНЛЛ к цитостатическим препаратам *in vitro* и ответ больных на терапию *in vivo*

№ п/п	№ больного	Лейкоз	FAB вариант	Пол	Возраст	Протокол индукции	баллы чувствительности клеток <i>in vitro</i>						Чувствительность к химиопрепаратам <i>in vitro</i> (S – чувствителен, R – устойчив)	Чувствительность к химиопрепаратам <i>in vivo</i> (S – чувствителен, R – устойчив)	Сравнение чувствительности <i>in vitro</i> / <i>in vivo</i>
							Цитарабин (Ц)	Доксорубин (Д)	Циклофосфан (Цф)	Винкристин (Вин)	Митоксантрон (Митг)	Преднизолон (Пр)			
1	742/01	AML	M 4	ж	56	7+3	4	7	7	7	7	7	R: Ц+Д	R: Ц+Д	R/R
2	19/00	AML	M 3	ж	49	7+3	5	7	7	7	7	7	R: Ц+Д	R: Ц+Д	R/R
3	354/01	AML	M 1	м	66	7+3	3	5	7	7	5	7	S: Ц+Д	R: Ц+Д	S/R
4	236/00	AML	M 1	м	56	7+3	7	7	7	7	7	7	R: Ц+Д	R: Ц+Д	R/R
5	915/00	AML	M 1	м	40	7+3	7	7	7				R: Ц+Д	R: Ц+Д	R/R
6	494/01	AML	M 1	ж	48	7+3	5	7	7	7	7	7	R: Ц+Д	R: Ц+Д	R/R
7	926/00	AML	M 1	м	58	7+3	3	6	7				S: Ц+Д	S: Ц+Д	S/S
8	860/01	AML	M 3	м	24	7+3	1	3					S: Ц+Д	S: Ц+Д	S/S
9	00/00	AML	M 4	ж	45	7+3	1	5	7	7	6	7	S: Ц+Д	S: Ц+Д	S/S
10	519/00	AML	M 1	м	53	7+3	4	6	7	6	7	7	R: Ц; S: Д	S: Ц+Д	S/S*

Примечание: клетки считали чувствительными к цитарабину *in vitro* если баллы чувствительности были [3], для доксорубина — [6].

*отмечены случаи, когда к одному из химиопрепаратов в тесте *in vitro* была отмечена устойчивость, а к другому — чувствительность, но суммарно ответ *in vitro* отмечен как S (клетки чувствительны)

Схема прогнозирования эффективности химиотерапии острых и хронических лейкозов на основе изучения химиочувствительности лейкозных клеток *in vitro*



Таким образом, предложенная схема представляет собой алгоритм по стандартизации применения МТТ-теста для оценки химиочувствительности и прогнозирования ответа в каждом отдельном онкогематологическом центре и должна при своей реализации учитывать специфические особенности лаборатории (оборудование, реагенты) и клинические подходы (протоколы, формы лейкозов), принятые в конкретном лечебном учреждении.