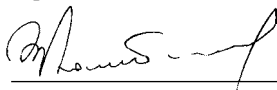


**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра здравоохранения



В.В. Колбанов

31 декабря 2003 г.

Регистрационный № 138–1103

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ КЛОНАЛЬНОСТИ  
ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК В ДИАГНОСТИКЕ  
ОСТРОГО ЛИМФОБЛАСТНОГО ЛЕЙКОЗА**

Инструкция по применению

**Учреждение-разработчик:** Республиканский научно-практический центр детской онкологии и гематологии

**Авторы:** А.Н. Мелешко, д-р мед. наук М.П. Потапнев

## **ВВЕДЕНИЕ**

Диагностика острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ), моноклонального по своему происхождению, основывается на выявлении в образцах костного мозга (КМ) и часто в периферической крови (ПК) большого количества клеток с атипическими свойствами, выявляемыми:

- микроскопически — при окраске мазков клеток по Романовскому — Гимзе;
- цитохимически — при окраске мазков клеток суданом черным на фосфолипиды или в ШИК-реакции на гликоген;
- иммунофенотипически — по маркерам CD3, CD4, CD8 (Т-линейный ОЛЛ), CD19, CD79a, CD10, s/cy Ig, CD20 (В-линейный ОЛЛ);
- цитогенетически — по наличию однотипных количественных и/или структурных нарушений хромосом;
- молекулярно-генетически — по обнаружению химерных онкогенов.

Основным результатом проводимых диагностических исследований является выявление большого (в процентном отношении) количества клеток лимфоидного ряда с однородными атипичными свойствами. В то же время каждый из перечисленных методов исследования имеет свои ограничения, связанные с чувствительностью, специфичностью, технологичностью исследования. За последние годы всё большее распространение получают новые молекулярно-генетические методы характеристики моноклональной популяции опухолевых клеток. Эти методы требуют небольшого количества исследуемого материала и не притязательны к условиям его хранения, выявляют опухолевые клетки в смешанных популяциях с высокой чувствительностью ( $10^{-4}$ – $10^{-6}$ ), обладают высокой специфичностью и объективностью полученных результатов. Среди них нами отработан и используется при диагностике ОЛЛ метод оценки клональности по реаранжировке генов иммуноглобулинов (Ig) и Т-клеточного рецептора (ТКР) в полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Метод основан на том, что нормальные лимфоциты имеют практически неограниченное количество типов реаранжировок генов Ig и ТКР. В опухолевых клетках определяется, как прави-

ло, один (или несколько) тип(ов) реаранжировки с выраженной моноклональностью ПЦР-амплификата соединительного (консенсусного) региона реаранжированного гена, отличающегося от поликлонального типа распределения амплификатов генов Ig и ТКР в нормальных зрелых лимфоцитах.

## **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ И РЕАГЕНТОВ**

*Необходимое оборудование:* термоциклер открытого типа (например, фирм «Perkin Elmer», «Biometra» и др.), стерильный бокс, скоростная центрифуга (например, фирм «Juan», «Eppendorf» и др.), микроцентрифуга (для пробирок типа Эппендорф с объемом 1,5 см<sup>3</sup>), спектрофотометр (фирмы «Perkin Elmer» или др.), термомиксер (фирмы «Eppendorf» или др.), аппарат для горизонтального электрофореза (например, фирм «Kodak», «Biosciences», «Sigma» и др.), аппарат для вертикального электрофореза (например, фирм «BioRad», «Amersham Biosciences» и др.), документирующая система изображения (например, фирм «BioRad», «Kodak», «Amersham Biosciences» и др.).

*Реагенты:* набор реагентов для выделения ДНК, набор реагентов для ПЦР, набор реагентов для электрофореза фрагментов ДНК в агаре, набор реагентов для электрофореза фрагментов ДНК в полиакриламидном геле.

## **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА**

### **Постановка теста**

*I. Исследуемый материал.* Исходным материалом служит клеточная взвесь, содержащая 5–10 млн лейкоцитов (2 мл взвеси клеток КМ и/или 10 мл ПК, стабилизированных 0,5 моль ЭДТА), или мононуклеарные клетки, выделенные на градиенте плотности фикоколл-верографина ( $D = 1,077 \text{ г/см}^3$ ) с последующей отмывкой лейкоцитов в фосфатно-солевом буфере (рН 7,4) при 1500 об./мин. в течение 10 мин.

*II. Выделение ДНК.* ДНК из образцов КМ или ПК, содержащих опухолевые клетки, выделяли по методике P. Chomczynski и N. Sacchi (1987).

1. Экстракция фенол-хлороформной смесью. Разрушение лейкоцитов в лизирующем буфере, содержащем 100 ммоль хлорида натрия, 10 ммоль Трис-НСl, 25 ммоль ЭДТА, 0,5% SDS, 0,1 мг/мл протеиназы К.

К образцу исследуемых клеток добавляли 600 мкл лизирующего буфера. Лизат инкубировали со встряхиванием при 50° С в течение 12–18 ч, затем экстрагировали равным объемом смеси фенол/хлороформ/изоамиловый спирт (25:24:1), встряхивали и центрифугировали в течение 5 мин при 1 700 g при комнатной температуре. Собирали верхнюю водную фазу, содержащую ДНК. Экстракцию проводили дважды.

Для осаждения ДНК добавляли 200 мкл 3 моль ацетата натрия рН 5,2 и 600 мкл изопропанола. Центрифугировали при +4° С, 14 000 об./мин в течение 20 мин. Осадок ДНК промывали 70% этанолом, высушивали и растворяли в 100 мкл ТЕ-буфера.

2. Альтернативно для выделения ДНК использовали TRI-реагент (Sigma). Для этого к осадку клеток добавляли 1 мл TRI-реагента, инкубировали при +20° С (комнатной температуре) в течение 5 мин, добавляли 200 мкл хлороформа, перемешивали и инкубировали в течение 10 мин при +20° С. Центрифугировали при 14 000 об./мин. (12 000 g), при +4° С в течение 15 мин. Интерфазу и нижний слой верхней фазы собирали, ДНК осаждали 96% этанолом и отмывали 0,1 моль цитратом натрия с 10% этанола. Осадок ДНК подсушивали и анализировали спектрофотометрически количественно и на примеси белка и полисахаридов.

*III. ПЦР.* В соответствии с рекомендациями Европейского многоцентрового исследования «Biomed-1 Concerted Action» (Pongers-Willemsse et al., 1999) используются следующие праймеры для выявления генов  $\delta$ - (тяжелой) и  $\gamma$ - (легкой) цепей ТКР I типа, а также генов легкой (L) и тяжелой (H) цепей Ig (табл. 1).

Реакцию ставили в объеме 50 мкл, куда вносили 5 мкл ПЦР-буфера (100 ммоль Трис-НСl, 500 ммоль КСl, 15 ммоль MgCl<sub>2</sub>), 4 мкл 2,5 ммоль dNTP (конечная концентрация 0,2 ммоль), 12,5 пкм каждого праймера, 1 ед. Таг-полимеразы и 100–500 пг ДНК образцов. Амплификацию проводили в термоциклере. Режим проведения ПЦР: 3 мин при 92° С, затем 40 (35 для IgH гена) циклов (92° С —

45 с, 60° С — 90 с, 72° С — 2 мин), затем 10 мин при 72° С. Соответствующий негативный (деионизированная вода) и позитивный контроль (моноклональный — образцы ДНК клеточной линии, представленные в табл. 2, поликлональный — образец ДНК здорового человека (донора крови)) использовался для каждой постановки реакции.

**Таблица 1**

**Перечень праймеров для оценки реаранжировки генов Ig  
и ТКР в ПЦР**

Ген	Название	Прямой/ обратный	Последовательность
TCRD	Vδ1-5'	прямой	ACTCAAGCCCAGTCATCAGTATCC
	Vδ2-5'	прямой	ACCAAACAGTGCCTGTGTCAATAGG
	Dδ2-5'	прямой/обратный	ACTCCATGTTCAAATAGATATAGTATT
	Dδ3-3'	обратный	GAAATGGCACTTTTGCCSCTGCAG
	Jδ1-3'	обратный	ACCTCTCCCAGGAGTCCTCC
TCRG	Vγ1-5'	прямой	CAGGCCGACTGGGTCACTCTGC
	Vγ1V-5'	прямой	CTGAAATATCTATTTCCAGACCAGC
	Jγ1.1/2.1-3'	обратный	TTACCAGGTGAAGTTACTATGAGC
	Jγ1.3/2.3-3'	обратный	CCGTATATGCACAAAGCCAAATC
IgK	VK1-5'	прямой	GTAGGAGACAGAGTCACCATCACT
	VK11-5'	прямой	TGGAGAGCCGGCCTCCATCTC
	intron-5'	прямой	GTTATTCCCAAAAGCTCAATCTCAAAG
	Kde-3'	обратный	CCCTTCATAGACCCTTCAGGCAC
IgH	FR2C	прямой	CCAGGGAAGGGNCTKGAGTGG
	FR3C	прямой	GACACGGCCGTGTATTACTG
	JHint	обратный	ACCAGGGTTCCTTGGCCCCA
	C-specific	обратный	CAGTCGACGAGGGGGAAAGGGTT

Предварительный анализ продуктов ПЦР проводили в 1,5% агарозном геле в аппарате для горизонтального электрофореза. Условия проведения электрофореза: 100 В, 100 мА, 30–40 мин. Длина пробега — 3–4 см под контролем маркеров молекулярной массы (50–2 000 п.о.). Результаты фиксировали визуально или с помощью документирующей системы. При наличии определяемых продук-

тов ПЦР в ДНК-содержащих образцах и их отсутствии в образце, содержащем воду, проводится гетеродуплексный анализ

Таблица 2

**Перечень клеточных линий, используемых в качестве положительного контроля для оценки клональности опухолевых клеток больных ОЛЛ**

Ген	Пары праймеров	Позитивный контроль	Величина транскрипта (п.о.)	Тип ОЛЛ
TCRD	V $\delta$ 1-5' : J $\delta$ 1-3'	Peer	452	T
	V $\delta$ 2-5' : J $\delta$ 1-3'	(пациент с T-лимфоцитным ОЛЛ)	443	T
	V $\delta$ 2-5' : D $\delta$ 2-5'	REN	501	B/T
	D $\delta$ 2-5' : D $\delta$ 3-3'	Nalm16	608	B/T
TCRG	V $\gamma$ 1-5' : J $\gamma$ 1.1/2.1-3'	Molt-4	329	B/T
	V $\gamma$ 1-5' : J $\gamma$ 1.3/2.3-3'	ALL-1	533	B/T
	V $\gamma$ 1V-5' : J $\gamma$ 1.3/2.3-3'	Jurkat	558	B/T
IgK	VK1-5' : Kde-3'	ROS15	433	B
	VK11-5' : Kde-3'	380	443	B
	intron-5' : Kde-3'	REN	511	B
IgH	1 шаг (FR2C : C-specific) 2 шаг (FR3C : JHint)	IM-9; Raji	80–150	B

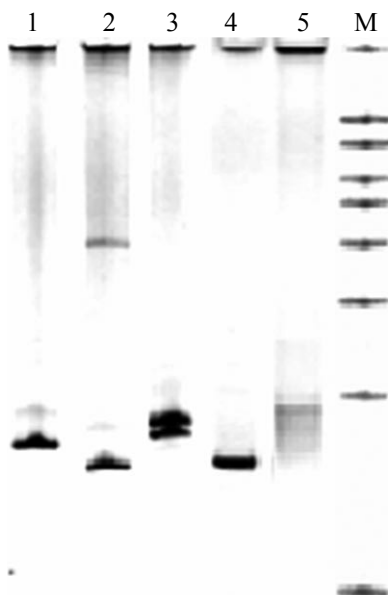
*IV. Гетеродуплексный анализ.*

Для идентификации моно- и поликлональных продуктов реакции ПЦР, неразличимых в агарозном геле, используется гетеродуплексный анализ в неденатурирующем полиакриламидном геле, основанный на различной подвижности гомодуплексов (идентичных транскриптов, что характерно для опухолевых клеток) и гетеродуплексов (неидентичных транскриптов, что характерно для нормальных лимфоцитов). Образование дуплексов проводили путем прогревания продуктов ПЦР в течение 5 мин при +95° С с последующим быстрым охлаждением в течение 1 ч при +4° С. Последующую визуализацию дуплексов проводили путем электрофореза в 10% полиакриламидном геле в 0,5× TBE-буфере. Электрофорез проводили в аппарате для вертикального электрофореза. Условия проведения электрофореза: 300–350 В, 12 мА, 1,5–2 ч. Длина пробега — 20 см под контролем ПЦР-маркера (50–2 000 п.о.). Гель окрашивают бромистым этидиумом, изображение переносят с

помощью документирующей системы и анализируют с помощью компьютерных программ.

### Интерпретация результатов

Визуализированное изображение результатов гетеродуплексного анализа продуктов ПЦР представлено на рис. 1 и 2.

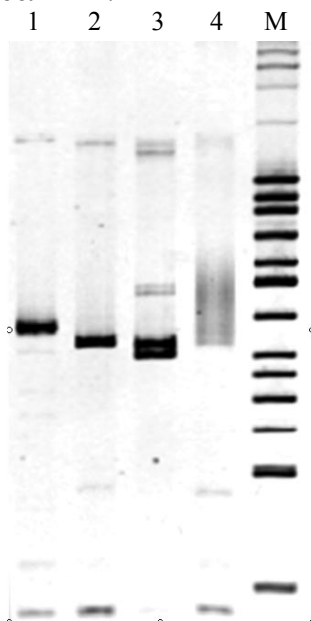


*Рис. 1. Гетеродуплексный ПЦР-анализ реаранжировки IgH гена: М — ПЦР-маркер 2000, 1500, 1000, 750, 500, 300, 150, 50 п.о.; 1–3 — пациенты с В-линейным ОЛЛ; 4 — В-клеточная линия Raji (моноклональный контроль); 5 — мононуклеары здорового донора (поликлональный контроль); в 3 линии присутствуют два фрагмента, соответствующие разным IgH генам (в популяции лейкозных клеток присутствуют два примерно равных клона или двуаллельная реаранжировка)*

Как видно из рис. 1, при оценке реаранжировки гена IgH поликлональный контроль (мононуклеары периферической крови здоровых людей) и позитивный контроль моноклональной лимфоидной линии Raji дают соответственно широкую или узкую полосу транскрипта(ов) в области детекции специфических продуктов ПЦР (в данном случае — 100–150 п.о.). Образцы ДНК больных В-линейным ОЛЛ дают, как правило, одну полосу, соответствующую одному моноклональному транскрипту. Это и является подтверждением моноклональности опухолевых клеток при ОЛЛ.

На рис. 2 представлен образец анализа клональности опухолевых клеток больных с Т-линейным ОЛЛ при использовании праймеров для выявления реаранжировки TCRG. Как видно из рисунка,

поликлональный тип специфических продуктов ПЦР (с размером около 500 п.о.) характерен для образцов ДНК здоровых людей, в то время как моноклональный — для продуктов ПЦР образцов ДНК больных.



*Рис. 2. Гетеродуплексный ПЦР-анализ реаранжировки гена TCRG с использованием V $\gamma$ I-5': J $\gamma$ 1.1/2.1-3' праймеров: М — ПЦР-маркер 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 250, 200, 150, 100, 50 п.о.; 1–3 — пациенты с Т-линейным ОЛЛ, моноклональная перестройка гена TCRG; 4 — мононуклеары здорового человека (поликлональный контроль)*

### **Практическая ценность теста**

По нашим данным, выявление моноклональности по реаранжировке генов Ig или ТКР:

- указывает на лимфоидную, но не миелоидную природу опухолевого процесса как в случаях первично выявленного, так и рецидива острого лейкоза;

- позволяет выявить минимальную резидуальную болезнь после проведения лечения ОЛЛ;

- характеризует наличие одного клона или нескольких субклонов опухолевых клеток, последнее связано с худшими показателями ответа на терапию и неблагоприятным исходом заболевания;

- помогает различать моноклональный опухолевый процесс и поликлональный лимфопролиферативный патологический процесс.



### **Область применения**

Острые и хронические лейкозы, неходжкинские лимфомы, другие лимфопролиферативные заболевания человека.

### **Дополнительная информация**

Перечень праймеров для выявления реаранжировки генов Ig и ТКР методом ПЦР периодически обновляется. С начала 2004 г. предполагается введение дополнительного перечня праймеров в результате проведения Европейского исследования «Biomed-2». Для Т- и В-линейных лимфопролиферативных заболеваний характерно наличие кросс-линейных реаранжировок, поэтому выявление одной из них не является обязательным признаком соответствующей Т/В-линейной принадлежности. Неполные реаранжировки TCRD локуса (V $\delta$ 2-D $\delta$ 3 и D $\delta$ 2-D $\delta$ 3), а также перестройки TCRG локуса с высокой частотой (50 и 30% соответственно) встречаются при В-линейных ОЛЛ и могут использоваться как дополнительные мишени для определения клональности или минимальной резидуальной болезни.

### **Меры предосторожности**

Выполнение метода определения клональности опухолевых клеток не требует специальных мер предосторожности, кроме принятых для лабораторной практики общего профиля.