

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

\_\_\_\_\_ Р.А. Часнойть

29.12.2010 г.

Регистрационный № 140-1110

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К ХИМИОПРЕПАРАТАМ  
ОСТАТОЧНЫХ ЛЕЙКЕМИЧЕСКИХ КЛЕТОК НА ЭТАПАХ  
ИНТЕНСИВНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ У ДЕТЕЙ С ОСТРЫМ ЛЕЙКОЗОМ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

ГУ «РНПЦ детской онкологии и гематологии»

АВТОРЫ:

Канд. биол. наук Шман Т.В., канд. биол. наук Савицкий В.П.,  
канд. биол. наук Белевцев М.В., Федосенко В.В., Мовчан Л.В.,  
др. мед. наук, проф. Алейникова О.В.

Минск 2009

## ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Сохранение остаточных опухолевых клеток в костном мозге (КМ) на этапах терапии и после нее может быть связано с резистентностью лейкоэмических клеток к проводимой терапии. В исследованиях, проведенных ранее, показано, что пациенты, лейкоэмические клетки которых резистентны к ряду химиопрепаратов *in vitro* на момент диагностики лейкоза, имеют повышенный риск развития ранних рецидивов (Den Boer M.L., 2002), что особенно выражено в группе пациентов высокого риска (Frost V.M., 2003). Лекарственная резистентность опухолевых клеток может быть опосредована различными механизмами, к числу которых относятся нарушения механизмов апоптоза и пролиферации, увеличенная экспрессия генов лекарственной резистентности и их белковых продуктов и др. (Plasschaert S.L., 2003; Kirschner-Schwabe R., 2006).

В случаях сохранения опухолевых клеток после проведенных этапов полихимиотерапии необходима информация о химиочувствительности этих клеток. При этом показатели чувствительности лейкоэмических клеток к препаратам, полученные до начала лечения, могут отличаться от таковых после проведенных этапов терапии. Это объясняется индукцией в клетках различных механизмов, защищающих клетку от токсического воздействия химиопрепаратов. Показано, что лейкоэмические клетки, выжившие после воздействия химиопрепарата, отличаются от исходной популяции опухолевых клеток по ряду свойств: экспрессии про- и антиапоптотических протеинов, некоторых тирозинкиназ, а также CD34. При этом свойства именно выживших клеток, а не общей популяции бластов, имеют клиническое значение при прогнозировании исхода заболевания (Kornblau S.M., 2006).

Поэтому адекватным для обоснования выбора протокола терапии является оценка индивидуальной лекарственной чувствительности *in vitro*. Особенно актуальным это является при химиорезистентных случаях лейкозов, при рецидивах заболевания. Методы детекции чувствительности клеток к лекарственным препаратам *in vitro* базируются на регистрации снижения клоногенной, пролиферативной или ферментативной активности лейкозных клеток при действии химиопрепаратов. Наиболее часто для установления химиочувствительности лейкоэмических клеток используется метил-тиазол-тетразолиум (МТТ) тест, который основан на определении общего уровня дегидрогеназной активности исследуемых клеток. В классическом варианте МТТ-теста изучали выживаемость клеток к различным дозам (не менее 5 концентраций, крайние из которых различаются в 1000 раз и более) цитостатических препаратов ([Pieters R., 1990). На основании средних значений жизнеспособности из 2-х параллельных измерений для каждой концентрации цитостатического препарата вычисляли концентрацию 50% подавления жизнеспособности (IC50) лейкозных клеток. Такой вариант теста не подходит для определения химиочувствительности остаточных опухолевых клеток, так как требует большого количества опухолевых клеток и их высокого процентного содержания в исследуемом образце. Таким образом, необходима

разработка теста, позволяющего определять химиочувствительность в образце с невысоким содержанием бластных клеток.

## **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, МАТЕРИАЛОВ И РЕАКТИВОВ**

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 цитофлуориметр с сортером клеток  
Спектрометр  
Термомиксер  
Супермикс для количественной ПЦР  
Тақ-полимераза  
В-меркаптоэтанол  
Агароза  
Вода деионизованная  
Изопропанол  
Ингибитор РНКаз  
Маркер молекулярного веса  
Обратная транскриптаза  
Растворы дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (дНТФ)  
Рэндом гексамеры  
Фенол-хлороформ-изоамиловый спирт (25:24:1)  
Фосфатно-солевой буфер  
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

## **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА**

### **Получение остаточных лейкемических клеток *in vitro***

КМ, полученный во время диагностической пункции до начала интенсивной полихимиотерапии, помещали в гепаринизированные пробирки (200 МЕ гепарина) и разводили средой RPMI-1640 (Sigma) с добавлением смеси антибиотиков (RPMI-A) в соотношении 1:1 или 2:1. Наслаивали 6–8 мл клеточной суспензии разведенного костного мозга на поверхность 4 мл Histopaque-1077 (Sigma). Центрифугировали 20 мин при 1800 об/мин при комнатной температуре. Далее с поверхности Histopaque-1077 собирали слой мононуклеарных клеток и переносили в пробирку, содержащую RPMI-A с добавлением минимум 1% эмбриональной сыворотки телят (ЭТС). Центрифугировали 10 мин при 1200 об/мин при комнатной температуре. Осажденные клетки ресуспендировали средой RPMI-A+1% ЭТС и осаждали 10 мин при 1200 об/мин.

Для получения остаточных лейкемических клеток *in vitro* выделенные клетки (2 млн/мл) культивировали в среде RPMI-A+10–15% ЭТС в присутствии 1–2 мкг/мл дексаметазона 48–72 ч. После окончания культивирования определяли процент погибших клеток по накоплению флуоресцентного зонда пропидиум иодида (PI). Выделение оставшихся жизнеспособных лейкемических клеток проводили с помощью сортировки методом проточной цитофлуориметрии на приборе FACSVantage SE (BD).

### **Определение уровня остаточных опухолевых клеток (минимальной остаточной болезни, остаточных лейкозных клеток) методом проточной цитофлуориметрии**

Определение остаточных клеток у детей с ОЛЛ и ОМЛ мы проводили методом трех- и четырехцветной проточной цитофлуориметрии (Белевцев М.В., 2006; Dworzak M.N., 2000, 2003). Для этого образец КМ в объеме от 2 до 5 мл помещали в пробирку Vacutaner (BD), содержащую антикоагулянт (калий ЭДТА). В течение не более 2–3 ч образец КМ доставляли в лабораторию и обрабатывали. По 100–300 мкл цельного костного мозга (в зависимости от объема и клеточности) помещали в специальные пробирки FALCON (BD) и добавляли по 20 мкл моноклональных антител, конъюгированных с FITC, PE и PE-Cy5, в следующих комбинациях при трехцветном иммунофенотипировании:

IgG1/IgG2a/CD19,                      CD45/CD14/CD19,                      CD20/CD10/CD19,  
CD58/CD10/CD19,

CD10/CD34/CD19, CD10/CD11a/CD19, CD45RA/CD10/CD19.

При четырехцветном фенотипировании использовали следующую комбинацию МКА, конъюгированных с FITC, PE, PE-Cy5 и PE-Cy7:

CD45/CD20/CD10/CD19;  
CD45/CD38/CD10/CD19;

CD45/CD34/CD10/CD19;

CD 45/CD11a/CD10/CD19; CD45/CD58/CD10/CD19.

Для миелобластных лейкозов: IgG1/IgG2a/CD45, CD45/CD14, CD7/CD13/CD45, CD34/CD33/CD45, CD34/CD117/CD45 (BD, США).

Образцы тщательно перемешивали и инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 30 мин. После инкубации лизировали эритроциты путем добавления 2 мл лизирующего раствора FACS Lysing Solution (BD). Пробы перемешивали и инкубировали в течение 5–7 минут в темноте. Осаждали клетки центрифугированием (3 мин при 2200 об/мин), надосадов сливали, а осадок встряхивали на Vortex. Добавляли буфер PBS Cell Wash (BD) и процедуру отмывки повторяли 2 раза. После этого к суспензии клеток добавляли 100–200 мкл 1% раствора параформальдегида.

Учет и анализ результатов проводили на проточном цитофлуориметре FACSCan (BD) в программах CellQuest Pro (трехцветное фенотипирование) и FC500 (Beckman Coulter) в программе СХР (четырёхцветное фенотипирование). Исследуемый образец отбирался для дальнейшего выделения остаточных лейкоэмических клеток и определения их химиочувствительности при содержании в образце  $>1 \times 10^{-4}$ .

#### **Магнитная сепарация остаточных лейкозных клеток (ОЛК)**

При содержании ОЛК в образце КМ более 5% и не сниженных показателях лейкоцитоза для выделения ОЛК можно применять магнитную селекцию с использованием коммерческих наборов. На основании иммунофенотипа ОЛЛ осуществляли выбор маркера для селекции. Наиболее часто проводили позитивную CD34 селекцию с помощью набора EasySep Human CD34 Selection Cocktail (StemCell Technologies, Канада) согласно протоколу, описанному в инструкции. Предварительно выделенные клетки ресуспензировали в буфере Дюльбекко, содержащем 2% ЭТС, добавляли EasySep Positive Selection Cocktail (антитела к CD34) и инкубировали при комнатной температуре 15 мин. Затем к суспензии клеток добавляли магнитные наночастицы и продолжали инкубирование еще 10 мин. После этого доводили общий объем суспензии до 2,5 мл буфером Дюльбекко, тщательно перемешивали образец и ставили его в магнит на 5 минут. Затем магнит поднимали и одним движением переворачивали сливая таким образом содержимое пробирки, при этом меченные антителами и магнитными частицами клетки оставались в пробирке. Повторяли процедуру проведения образца через магнит до желаемой чистоты выделения клеток. Чистоту выделения определяли с помощью проточной цитофлуориметрии.

#### **Сортировка остаточных лейкоэмических клеток с помощью проточного цитофлуориметра**

Образец, содержащий ОЛК, полученные *in vitro* или *in vivo*, окрашивали соответствующими комбинациями специфических МКА, позволяющими идентифицировать лейкоэмические клетки у конкретного пациента, затем

отмывали в среде RPMI-A+1% ЭТС. Для предотвращения прерывания процесса сортировки клеток предварительно удаляли клеточные агрегаты фильтрованием суспензии клеток через фильтры (70  $\mu\text{m}$ , BD), после чего клетки ресуспензировали в среде RPMI-A+20% ЭТС.

Для селекции популяции остаточных лейкемических клеток мы использовали 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 мы проводили регистрацию и анализ параметров светорассеяния и флуоресценции клеток для идентификации злокачественных клеток и определения алгоритма их сортировки. Для выделения остаточных лейкемических клеток мы использовали керамические наконечники, превышающие размер клеток в 7–10 раз, что позволяло исключить закупоривание наконечника клетками. Процедуру сортировки проводили с использованием аргонового лазера, мощностью менее 50 мВт для исключения повреждения опухолевых клеток в процессе селекции.

После прохождения зоны анализа капли потока, содержащие клетки, выбранные для селекции, получали электрический заряд. Используя вибрацию керамического наконечника, получали упорядоченный поток капель, содержащий как лейкемические 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 лейкемические клетки, выбранные для селекции, и направляли их в пробирку для сбора клеток. В отличие от метода разделения субпопуляций лейкемических клеток формирование второго бокового потока не проводили, а капли, содержащие примесь нормальных клеток, не отклоняя, направляли в резервуар для отходов.

Сбор обогащенной фракции клеток осуществляли в стеклянные пробирки объемом 15 мл, что позволило проводить сортировку клеток непрерывно в течение продолжительного времени (более 2 ч). В пробирки перед сортировкой добавляли RPMI-A+30–50% ЭТС, что способствовало предотвращению прилипания клеток к стенкам пробирки. Важным моментом является выбор материала пробирок для сбора клеток. Поскольку капли отклоняемых потоков несут электрический заряд, 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 лекарственной чувствительности остаточных лейкемических клеток**

Выделенные с помощью магнитной сепарации или сортировки остаточные лейкемические клетки в концентрации 2 млн/мл (в случае низкой клеточности — 1,2–1,8 млн/мл) помещали в среду RPMI-A с 20% ЭТС, 2 мМ глутамин и смесью антибиотиков. В культуральную среду дополнительно

добавляли смесь ITS (инсулина, трансферрина и селенита натрия, Sigma) до конечной концентрации каждого компонента 5 мкг/мл, 5 мкг/мл и 5 нг/мл соответственно. Аликвоты клеточной суспензии (80 мкл) добавляли в 96-луночные круглодонные планшеты, содержащие по 20 мкл тестируемых цитостатиков.

Тестировали следующие концентрации химиопрепаратов:  
дексаметазон (Dxm) 6,0 мкг/мл; преднизолон (Predn) 31,25 мкг/мл;  
винкристин (Vincr) 0,78 мкг/мл; L-аспарагиназа (L-Asp) 2,0 ЕД/мл;  
рубомидин (Rub) 0,125 мкг/мл; цитарабин (Ara-C) 10,0 мкг/мл;  
этопозид (VP-16) 50,0 мкг/мл.

Планшет помещали в инкубатор с 5% CO<sub>2</sub> на 24–72 ч при температуре 37 °С.

По истечении времени культивирования клетки из лунок переносили в пробирки, отмывали в PBS и определяли количество погибших клеток с помощью флуоресцентных зондов пропидиум иодида (PI) или CMXros.

Для расчета доли погибших клеток с помощью PI в пробирки, содержащие клетки в объеме 100–200 мкл, добавляли по 10 мкл раствора PI и немедленно анализировали на проточном цитофлуориметре. Мертвые клетки отличались высокой интенсивностью накопления PI.

Использование зонда CMXros позволяет выявлять мертвые и апоптотические клетки. Для этого к суспензии клеток в PBS (500 мкл) добавляли раствор CMXros (500 мкл) в конечной концентрации 25 нМ и инкубировали 30 мин при 37 °С. После этого клетки отмывали в PBS и анализировали на проточном цитофлуориметре. Мертвые и апоптотические клетки отличались сниженной интенсивностью флуоресценции CMXros (Poot M., 1997).

### **Определение уровней экспрессии генов лекарственной резистентности и апоптоза в остаточных лейкоэмических клетках**

Экстракцию тотальной РНК из выделенных с помощью магнитной сепарации или сортировки остаточных лейкоэмических клеток проводили 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 полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени (iCycler, BioRad) с использованием клеточной линии IM9 в качестве контроля и калибратора. Для нормализации количества кДНК, вносимой в реакцию использовался нормальный ген GUS. Для расчета относительного количества РНК исследуемого гена применяли 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 200н М TaqMan пробы. В работе были использованы следующие праймеры и пробы: Vcl-2 прямой праймер: TTG GCC CCC GTT GCT T, обратный праймер: CGG TTG TCG TAC CCC GTT CTC, TaqMan проба: FAM AGC GTG CGC CAT CCT TCC CAG BHQ1; 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. Нормальный ген GUS и последовательности праймеров и пробы для него разработаны и рекомендованы для использования при нормализации количества кДНК в рамках программы «Европа против рака» (Gabert J, 2003).