

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Р.А. Часнойть

30 января 2009 г.

Регистрационный № 161-1208

**ДИАГНОСТИКА ЛЕКАРСТВЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ
ЛЕЙКОЗНЫХ КЛЕТОК *IN VITRO***

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: ГУ «РНПЦ гематологии и трансфузиологии», ГУ «РНПЦ детской онкологии и гематологии»

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф. А.И. Свирновский, Т.Ф. Сергиенко, канд. биол. наук Т.В. Шман, А.В. Бакун, И.Б. Тарас, П.В. Хлебко, д-р мед. наук, проф. О.В. Алейникова

Минск 2009

Определение лекарственной чувствительности лейкозных клеток *in vitro* позволяет прогнозировать ответ этих клеток на терапевтические воздействия и выбирать препараты или определяемые конкретными протоколами комбинации цитостатиков, которые максимально подавляют жизнеспособность клеток, составляющих морфологический субстрат опухоли. В таких случаях доклиническая диагностика лекарственной чувствительности лейкозных клеток является даже более адекватным основанием принятия решения о выборе тактики терапии в конкретных условиях, чем просто учет стандартных параметров, в т. ч. и рекомендуемых молекулярно-биологических, определяющих группы риска, что не исключает их комплементарности, так как речь идет о немедленном прогнозировании ответа на лекарственные препараты в большей степени, чем об отдаленном прогнозе течения заболевания.

Инструкция по применению предназначена для врачей-гематологов и врачей клиничко-диагностических лабораторий республиканских научно-практических центров, городских и областных больниц, в которых осуществляется лечение лейкозов детей и взрослых.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, ПРЕПАРАТОВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Оборудование

Ламинарный бокс 2 класса безопасности.

Центрифуга с горизонтальным ротором, обеспечивающим 1500 об/мин, типа ОПН-3.

Световой микроскоп с увеличением в 200 раз.

СО₂ инкубатор с увлажнителем газа.

Микропланшетный спектрофотометр с фильтром 540 нм.

Холодильник +4° С.

Морозильник -20° С.

Одно- и многоканальные дозаторы переменного объема 2–1000 мкл.

Материалы

Камера Горяева.

Стерильные центрифужные пробирки, 15 мл.

Стерильные пастеровские пипетки.

Стерильные 96-луночные кругло-/плоскодонные планшеты.

Стерильные наконечники для автоматических пипеток.

Штативы для пробирок.

Стерильные микропробирки 1,5 мл.

Пробирки для забора крови с антикоагулянтом.

Реактивы

Гистопак или Лимфопреп.

Раствор натрия хлорида изотонический 0,9%.

Среда RPMI-1640.

Термоинактивированная эмбриональная телячья сыворотка.
L-глутамин.
Антибиотики пенициллин и стрептомицин.
Трипановый синий.
МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид).
Изопропанол.
Соляная кислота.
Смесь инсулин, трансферрин, селенит натрия (ITS).
Могут быть использованы другое оборудование и материалы, не уступающие по точности и характеристикам рекомендуемым.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Выбор терапии при впервые диагностируемых лейкозах.
Выбор отсроченной терапии при лейкозах.
Выбор терапии при рецидивах лейкозов.
Текущий мониторинг лекарственной чувствительности лейкозных клеток.
Появление клинических признаков рефрактерности к терапии.
Диагностика перекрестной лекарственной резистентности клеток.
Определение сочетаний препаратов с противолейкозной активностью.
Составление новых протоколов терапии, в т. ч. и терапии спасения.
Скрининг потенциальных противолейкозных препаратов.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СПОСОБА

Приготовление рабочих растворов

Раствор антибиотиков: для получения раствора антибиотиков в конечных концентрациях 100000 Ед/мл пенициллина и 100 мг/мл стрептомицина растворить 500000 ЕД пенициллина и 0,5 г стрептомицина в 5 мл раствора натрия хлорида 0,9%, разлить дробно, хранить при температуре -20° С.

Раствор L-глутамин: для приготовления раствора в конечной концентрации 200 мМ развести 1,46 г L-глутамин в 50 мл раствора натрия хлорида 0,9%, стерилизовать с помощью фильтра с размером пор 0,22 мкм, разлить дробно, хранить при температуре -20° С.

Полная культуральная среда: в среду RPMI-1640 внести 5 мл эмбриональной телячьей сыворотки, 0,5 мл раствора L-глутамин в концентрации 200 мМ, 50 мкл смеси антибиотиков. Для анализа образцов пациентов с острыми лейкозами, особенно с острым лимфобластным лейкозом, дополнительно внести 0,5 мл смеси ITS. Довести средой RPMI-1640 до конечного объема 50 мл. Хранить при +4° С.

Раствор МТТ: растворить 1 г реактива МТТ в 100 мл раствора натрия хлорида 0,9%, стерилизовать с помощью фильтра с размером пор 0,22 мкм, разлить дробно, хранить при температуре -20° С.

Раствор солюбелизатора: в 997 мл изопропанола внести 3 мл концентрированной соляной кислоты, перемешать. Хранить при -20° С.

Раствор трипанового синего 0,5%: смешать 50 мг трипанового синего и 10 мл раствора натрия хлорида 0,9% с 0,1% азидом натрия, профильтровать. Хранить при комнатной температуре.

Растворы химиопрепаратов:

Готовить исходя из следующих данных таблицы 1 и 2, разлить дробно. Хранить при -20° С. При постановке теста в лунку вносить по 5 мкл раствора соответствующего рабочего раствора.

Взятие образцов лейкозных клеток

Свежеполученные образцы костного мозга, периферической крови, пунктатов лимфатических узлов, спинномозговой жидкости или плевральной жидкости пациентов с лейкозами могут быть использованы при содержании в них достаточного количества лейкозных клеток (необходимое содержание клеток определяется набором химиопрепаратов, которые планируется включить в исследование). Материал поместить в пробирки с расчетным конечным содержанием гепарина 20 ЕД/мл или в специальные пробирки промышленного изготовления с ЭДТА или гепарином. Пробирки транспортировать в лабораторию при комнатной температуре.

Таблица 1

Приготовление растворов лекарственных препаратов для определения чувствительности к ним клеток при хронических лейкозах

№	Препарат *	Концентрация исходного раствора	Концентрация рабочего раствора	Приготовление рабочего раствора		Концентрация в культуре, соответствующая терапевтической
				Количество исходного раствора, мкл	Количество физиологического раствора, мкл	
1	Винкристин, мкг/мл	100	1	10	990	0,05
2	Дексаметазон, мкг/мл	4000	100	25	975	5
3	Доксорубицин, мкг/мл	2000	20	10	990	1
4	Лейкеран**, мкг/мл	2000	40	20	980	2
5	Лейкладин, мкг/мл	1000	40	40	960	2
6	Преднизолон, мкг/мл	25000	60	2	998	30
7	Флударабел, мкг/мл	50000	100	2	998	5
8	Циклофосфан, мкг/мл	200000	200	1	999	10
9	Цитарабин, мкг/мл	10000	600	60	940	30
10	Иматиниб**, мкг/мл	10000	1200	120	880	60
11	Гидроксимочевина, мг/мл	25	5	200	800	0,25

12	6-меркаптопурин**,мкг/мл	10000	400	40	960	20
13	Рубомицин, мкг/мл	1000	20	20	980	1
14	Этопозид, мкг/мл	10000	300	30	970	15
15	Метотрексат, мкг/мл	10000	280	28	972	14
16	Ритуксимаб, мкг/мл	100000	3000	30	970	150
17	Алемтузумаб, мкг/мл	30000	39	1,3	998,7	2

Таблица 2

Приготовление растворов лекарственных препаратов для определения чувствительности к ним клеток при острых лейкозах

№	Препарат*	Концентрация исходного раствора	Концентрация рабочего раствора	Приготовление рабочего раствора		Концентрация в культуре, соответствующая терапевтической
				Количество исходного раствора, мкл	Количество физиологического раствора, мкл	
1	Винкристин, мкг/мл	1000	62	62	938	3,1
2	Дексаметазон, мкг/мл	4000	15	3,7	996	0,75
3	Доксорубин, мкг/мл	1000	10	10	990	0,5
4	Преднизолон, мкг/мл	12500	625	50	950	31,25
5	Аспарагиназа, Ед/мл	5000	40	8	992	2
6	Цитарабин, мкг/мл	50000	100	2	998	10
7	Рубомицин, мкг/мл	1000	10	10	990	0,5
8	Этопозид, мкг/мл	20000	250	12,5	987,5	12,5

*Перечень препаратов может быть дополнен другими, в т.ч. и новыми, с соответствующим расчетом их концентраций для исследования *in vitro*.

**Препараты, если они представлены в водонерастворимой форме, можно растворять в диметилсульфоксиде (ДМСО) с постановкой контроля с соответствующей концентрацией ДМСО (в среде культивирования не более 0,5%).

Выделение клеток

Развести взятый биологический материал физиологическим раствором в соотношении 1:2. Разведенный материал медленно наложить в центрифужной пробирке на Гистопак или Лимфопреп в соотношении 2 мл раствора для разделения лейкоцитов и 8 мл разведенного биоматериала. Центрифугировать в течение 30 мин при 1500 об/мин. Дозатором собрать образовавшееся интерфазное кольцо лейкоцитов и перенести в отдельную пробирку. Отмыть лейкозные клетки путем добавления физиологического раствора с дальнейшим центрифугированием при 1500 об/мин в течение 15 мин. Супернатант удалить, осадок ресуспендировать при добавлении физиологического раствора. Центрифугировать в течение 10 мин при 1500 об/мин. Супернатант удалить. В зависимости от величины осадка его развести в 1–5 мл полной среды для культивирования.

Подсчет количества лейкозных клеток

Приготовить смесь из 10 мкл полученных на предыдущем этапе лейкозных клеток и 10 мкл раствора трипанового синего. В течение нескольких минут загрузить ее в камеру Горяева и подсчитать количество неокрашенных лейкоцитов (живые клетки) и окрашенных в синий цвет (мертвые клетки). Произвести расчет процента жизнеспособности и концентрации клеток в полученной взвеси. При жизнеспособности выделенных клеток более 70% ресуспендировать клетки в полной культуральной среде в концентрации 2×10^6 /мл.

Культирование клеток

В первую вертикальную дорожку (лунки 1А-1Н) 96-луночного планшета внести по 100 мкл полной культуральной среды. В остальные лунки внести по 95 мкл полученной клеточной взвеси; в те же лунки добавить исследуемые препараты в концентрациях, указанных выше. Для каждого препарата использовать по три лунки (дублирующие друг друга триплеты необходимы для получения среднего значения и ошибки среднего). Для контрольной оценки выживаемости интактных клеток в лунки 2А-4А планшета химиопрепаратов не добавлять (нулевое значение оптической плотности при считывании результатов). Планшет поместить в CO₂-инкубатор, инкубировать в течение 44 ч (при острых лейкозах, особенно у детей, до 96 ч).

Постановка МТТ-теста

По истечении времени инкубации во все лунки планшета внести стерильно по 20 мкл раствора МТТ, инкубировать в CO₂-инкубаторе в течение 4–6 ч. Добавить в каждую лунку по 100 мкл солубелизатора. Для полноты растворения энергично пипетировать (20–30 толчков на лунку).

Учет результатов

Перенести планшет в планшетный спектрофотометр, измерить оптическую плотность при длине волны $\lambda = 540$ нм. В зависимости от типа спектрофотометра необходимо задать «обнуление» значения оптической плотности по лункам 1А-1Н на самом приборе. Если возможности прибора не позволяют это сделать, необходимо вычесть среднее фоновое значение оптической плотности полной культуральной среды, находящейся в лунках 1А-1Н, из значений оптических плотностей для исследуемых лунок.

Перевести полученные результаты в проценты, используя формулы:

$$ЖК = \frac{ОП1 - ОПф}{ОП2 - ОПф} \times 100\% \text{ или}$$

$$ЖК = \frac{ОП1}{ОП2} \times 100\%$$

(формула используется, если прибор автоматически вычитает фоновое значение среды), где ЖК — жизнеспособность клеток, ОП1 — средняя оптическая плотность триплета лунок с клетками, которые подвергались воздействию; ОП2 — средняя оптическая плотность триплета лунок с интактными клетками; ОПф — средняя оптическая плотность лунок с полной культуральной средой. Результаты считать адекватными, если ОП1 —

ОПф > 0,05. Рассчитать среднее значение и ошибку среднего для каждого анализируемого цитотоксического соединения, используя соответствующие стандартные статистические формулы или компьютерные статистические программы.

Трактовка результатов

Определить чувствительность лейкозных клеток к химиопрепаратам в соответствии с табл. 3.

Таблица 3

Классификация чувствительности клеток *in vitro*

Фракция выживших клеток, %	Чувствительность лейкозных клеток к препарату
< 15	Очень высокая
15–39	Высокая
40–59	Умеренная
60–89	Низкая
≥ 90	Резистентность

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Низкое количество клеток в исследуемом образце; пути устранения: концентрирование этих клеток, имея в виду последующее ограничение спектра исследуемых препаратов.

Результаты могут быть неадекватны при содержании лейкозных клеток в образце менее 70%; пути устранения: повторная постановка теста.

Непостоянство лекарственной чувствительности клеток в процессе терапии; пути устранения: проведение исследования непосредственно перед решением вопроса о назначении терапии, повторные определения при необходимости смены терапии в процессе течения заболевания.

Трудность учета действия препаратов при последовательном применении, метаболизма цитостатиков в печени, скорости выведения препаратов из организма, реакций организма на лейкозные клетки; пути устранения: оценка клинических и стандартных лабораторных показателей ответа пациента на терапию.