

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель Министра

_____ Р.А. Часнойть
23 марта 2007 г.
Регистрационный № 167-1105

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТРОМАЛЬНО-ЗАВИСИМОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ
ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ У ПАЦИЕНТОВ С ЛИМФОИДНЫМИ
ЛЕЙКОЗАМИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: ГУ «Республиканский научно-практический центр гематологии и трансфузиологии», ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии и гематологии»

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф. А.И. Свирновский, В.В. Пасюков, канд. биол. наук Т.В. Шман

Минск 2007

Тестирование чувствительности клеток при лимфопролиферативных заболеваниях (ЛПЗ) *in vitro* находит все более широкое применение как для выбора и коррекции назначаемых протоколов химиотерапии, так и для разработки новых подходов к преодолению лекарственной устойчивости, которая является основным сдерживающим фактором в успешном лечении гемобластозов.

В то же время клиническая картина течения ЛПЗ и данные, полученные в лабораторных тестах, не всегда совпадают. Такие расхождения могут быть обусловлены тем, что условия *in vitro* не отражают весь комплекс факторов, влияющих на устойчивость клеток к терапии *in vivo* – наличие ростовых и антиапоптотических факторов, продуцируемых микроокружением, в частности, клетками стромы кроветворных органов. Другими словами, не учитывается так называемый стромальный фактор резистентности, под которым понимают совокупность механизмов избегания лейкозными клетками апоптоза благодаря культивированию в присутствии клеток стромы костного мозга, что приводит к снижению прогностической ценности исследований.

Учет стромального фактора резистентности способствует повышению точности при прогнозировании устойчивости ЛПЗ к химиотерапии, определении группы риска и возможного течения заболевания.

Инструкция по применению предназначена для научно-практических гематологических центров.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, ПРЕПАРАТОВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Необходимое оборудование

1. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки.
2. Пипетки стеклянные на 1, 2, 5, 10 мл.
3. Предметные стекла.
4. Покровные стекла.
5. Пробирки Эппендорф 1,5 см³.
6. Ламинарный бокс для работы с клеточными культурами в стерильных условиях.
7. Планшетный ИФА-анализатор.
8. Центрифуга ОПн-5.
9. Термостат, допускается инкубатор с подачей CO₂.
10. Источник CO₂.
11. Холодильник для хранения ростовой среды и других растворов при температуре 4±2°C.
12. Морозильник для хранения эмбриональной телячьей сыворотки и других растворов при температуре –18±2°C.
13. Сушильно-стерилизационный шкаф.
14. Микроскоп световой (x200-400) для подсчета клеток в камере Горяева.
15. Инвертированный микроскоп.

16. Ионномер универсальный.
17. Камера Горяева.
18. Счетчик Адамса для подсчета клеток.
19. Для клеточных культур используют стерильные: флаконы для тканевых культур с площадью роста 25 см² и вместимостью 50 мл;
- 96-луночные плоскодонные планшеты;
- крышки с/без аэрации для соответствующих флаконов;
- флаконы из стекла для бактериальных и вирусных препаратов вместимостью 5, 10, 250 мл;
- пробки резиновые;
- пинцет;
- автоматические дозаторы на 5, 20, 200, 1000 мкл;
- наконечники для автоматических дозаторов.

Реактивы

1. Фиколл-400.
2. Верографин 76 или 60%.
3. Лимфопреп либо гистопак.
4. Гепарин, стерильный раствор для инъекций, в 1 мл 5 тыс. ЕД.
5. Изопропанол.
6. Додecilсульфат натрия.
7. Соляная кислота.
8. Хлорид натрия, изотонический раствор 0,9% для инъекций.
9. NaCl порошок.
10. KCl порошок.
11. Na₂HPO₄ порошок.
12. KH₂PO₄ порошок.
13. Среда RPMI-1640.
14. Эмбриональная телячья сыворотка.
15. L-глутамин.
16. Пенициллин.
17. Стрептомицин.
18. Уксусная кислота.
19. Раствор трипсин+ЭДТА 0,25%.
20. Трипановая синь.
21. Фосфатный буферный раствор (PBS).
22. 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил тетразолиум бромид (МТТ).
23. Лекарственные препараты.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

1. Определение чувствительности лимфоидных клеток периферической крови и/или костного мозга больных с впервые установленным диагнозом хронического лимфоцитарного лейкоза, острого лимфобластного лейкоза к воздействию химиопрепаратов.

2. Мониторинг лекарственной резистентности опухолевых лимфоидных клеток в процессе типовой терапии с целью ее индивидуализации.
3. Разработка новых протоколов химиотерапии лейкозов.
4. Доклинические испытания новых лекарственных препаратов.

Приготовление реактивов

1. Рабочий раствор верографина: 72,34 мл 76% верографина растворить в 79,34 мл бидистиллированной воды или 72,34 мл 60% верографина растворить в 47,66 мл дидистиллированной воды.
2. Рабочий 9% раствор фиколла: 22,5 г фиколла растворить в 227,5 мл подогретой бидистиллированной воды. Плотность раствора – 1,025.
3. Рабочий раствор фиколла-верографина: 7 частей верографина и 16 частей фиколла (105 и 240 мл). Плотность – 1,077. Смесь разлить в стерильные бутылки, закрыть стерильными пробками и хранить в морозильнике. Перед использованием разморозить нужное количество.
4. Основной раствор антибиотиков: пенициллин 100 тыс. ЕД/мл + стрептомицин 100 мг/мл.
5. Полная питательная среда: среда RPMI-1640, содержащая 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 1% L-глутамина, 0,1% смеси антибиотиков.
6. Фосфатный буферный раствор (PBS): 8 г NaCl, 0,2 г KCl, 1,44 г Na₂HPO₄, 0,24 г KH₂PO₄ в 1 л дистиллированной воды. Довести до pH=7,4.
7. Раствор МТТ: 5мг/мл 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил тетразолиум бромида в PBS.
8. Раствор для подсчета лимфоидных клеток в камере Горяева: 400 мкл 3% уксусной кислоты
9. Раствор для подсчета стромальных клеток в камере Горяева: 0,5 г трипановой сини растворить в 100 мл 0,9% NaCl.
10. Растворы лекарственных препаратов в концентрациях, соответствующих терапевтическим.

Примечание: вместо раствора фиколл-верографин могут использоваться готовые растворы лимфопрепа или гистобака.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СПОСОБА

Выделение стромальных клеток

Используют пунктат костного мозга лиц, обследуемых по медицинским показаниям, при отсутствии у них опухолевых заболеваний крови. Гепаринизированный пунктат развести физиологическим раствором в 2 раза. Медленно наложить в пробирке на фиколл-верографин либо на лимфопреп, либо на гистобака в соотношении 1:4 (раствор:пунктат). Центрифугировать в течение 30 мин при 1500 об./мин. Мононуклеары образуют белое кольцо на поверхности фиколл-верографина. Пипеткой с тонким концом собрать белое кольцо, содержащее мононуклеары и стромальные клетки, и перенести в отдельную пробирку. Отмыть клетки

путем добавления среды RPMI-1640 и центрифугирования при 1200 об./мин в течение 15 мин. Супернатант слить, осадок ресуспендировать в полной среде RPMI-1640. Полученную суспензию использовать как источник для получения культуры стромальных клеток.

Выделение мононуклеаров из периферической крови и/или костного мозга больных лейкозами

Аналогично выделению стромальных клеток. Вместо RPMI-1640 везде использовать физиологический раствор. Производить непосредственно перед исследованием химиорезистентности клеток.

Культивирование стромальных клеток

Суспензию, содержащую стромальные клетки, поместить в 25 мл культуральный флакон-«матрас». Клетки инкубировать в течение 4 ч при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO₂ (стандартные условия), после чего удалить среду над клетками и заменить ее новой полной средой и вновь поместить в стандартные условия. Каждые 5-7 дней производить замену 30-50% среды над клетками. За ростом стромального клеточного монослоя наблюдать в инвертированный микроскоп. Обычно монослой образуется на 10-14 день после начала культивирования. После достижения клетками монослоя провести пересев первичной стромальной культуры. Для этого собрать среду над клетками, перенести ее в отдельный стеклянный флакон. Клетки в «матрасе» дважды промыть чистой средой RPMI-1640 комнатной температуры (среду наслоить по дну в объеме 3-4 мл, после чего удалить). К клеткам добавить 1 мл раствора трипсина+ЭДТА комнатной температуры так, чтобы он ровно покрывал всю поверхность дна. Через 20-30 с раствор полностью удалить. Вновь наслоить на клетки 1 мл раствора трипсина+ЭДТА и поместить «матрас» с культурой в термостат при 37°C на 5 мин. Не удаляя раствор трипсина+ЭДТА, в «матрас» залить 3-4 мл полной среды. Суспензию клеток перенести в пробирку и отмыть не менее 2 раз путем центрифугирования (по 3-4 мин, 1000-1500 об./мин.). Добавить к осадку 1 мл полной среды. Клетки подсчитать по стандартной методике, после чего ресуспендировать в полной среде в концентрации 3×10^5 /мл и пересадить в новый «матрас» (для поддержания культуры стромальных клеток) или культуральную пластиковую плашку (для последующего исследования химиорезистентности клеток больных лейкозами). Новая полная среда должна содержать 12-15% среды, которую собирают над пересаживаемыми клетками перед их первой промывкой RPMI-1640. Стромальные клетки внести в лунки 2-4, 5-7 вертикальных дорожек планшета (дублирующие друг друга триплеты необходимые для получения среднего значения и ошибки среднего). В дальнейшем оптическую плотность дорожек 2-4 необходимо вычесть из оптической плотности дорожек 5-7. Клеточную культуру стромальных клеток, которая пересажена в «матрас», поддерживать путем пересевов как сток-культуру в течение 2 недель до сохранения жизнеспособности.

Определение устойчивости клеток к химиопрепаратам

Приготовленную полную питательную среду без клеток дозатором внести в пустые лунки первой вертикальной дорожки 96-луночного планшета по 100 мкл в каждую лунку.

Мононуклеары в количестве 2×10^6 на мл по 90 мкл добавить в лунки планшета, содержащие монослой стромальных клеток. Исследуемый цитостатический препарат в необходимых концентрациях внести в соответствующие лунки с клетками, кроме первой дорожки и первых лунок всех дорожек.

Примечание: Концентрации препарата должны быть рассчитаны таким образом, чтобы конечный объем цитостатика в лунке соответствовал 10 мкл.

Закрытый 96-луночный планшет с анализируемыми концентрациями исследуемого соединения и клетками перенести в стерильный эксикатор с увлажненной 5% CO_2 атмосферой. Перенести эксикатор в термостат и инкубировать планшет при температуре 37°C в течение 48 ч. На последние 4 ч в каждую тестируемую лунку планшета (в том числе и в лунки, которые содержат только ростовую среду) добавить по 20 мкл приготовленного раствора МТТ. В каждую анализируемую лунку (в том числе и в лунки, которые содержат только ростовую среду) добавить по 100 мкл солюбилизирующей смеси, содержащей изопропанол, 10% додецилсульфата натрия, 0,01 N соляной кислоты. Для полноты растворения содержимое лунок энергично пипетировать (20-30 толчков на лунку). Закрытый планшет перенести в холодильник и выдерживать в течение 20-25 мин до осаждения пены в тестируемых лунках.

Учет результатов

Планшет перенести в ИФА-анализатор, предварительно установив на приборе фильтр с $\lambda=540$ нм. Для «обнуления» первой вертикальной дорожки планшета (содержит только ростовую среду), которая используется для нулевого значения оптической плотности, нажать клавишу «BLANK» на приборе. Для получения цифровых значений оптических плотностей в тестируемых лунках нажать клавишу «START» на приборе. Выживаемость клеток (ВК) определить по следующей формуле:

$$\text{ВК}\% = (\text{ОПл} - \text{ОПс}) / (\text{ОПк} - \text{ОПс}) \times 100\%, \quad (1)$$

где ОПл – оптическая плотность опытных лунок,

ОПк – оптическая плотность лунок контроля жизнеспособности клеток,

ОПс – оптическая плотность лунок контроля среды без клеток.

В качестве ОПл использовать среднее арифметическое оптических плотностей трех дублей каждого разведения препарата. Результаты считать адекватными, если $\text{ОПк} - \text{ОПс} > 0,05$. Концентрацию 50%-го ингибирования (IC50) определить по графику устойчивости путем аппроксимации.

Трактовка результатов

Если IC50 для исследуемого химиопрепарата находится в пределах его терапевтических доз, то исследуемые клетки больного лейкозом можно считать чувствительными к препарату. Если IC50 для исследуемого химиопрепарата превышает диапазон терапевтических доз, то препарат следует считать низкоэффективным и малопригодным для типовой терапии.

Требования техники безопасности

Работа с кровью, цитостатическими препаратами и реагентами проводится в стерильных условиях (лабораторных боксах) с использованием средств индивидуальной защиты (халат, фартук, резиновые перчатки, защитные очки). Отработанные образцы крови, лабораторная посуда, перевязочный материал и другие предметы, контактирующие с кровью и цитостатическими препаратами, собираются в отдельные специальные промаркированные емкости для последующей дезинфекции и/или сжигания.