

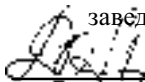
МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

СОГЛАСОВАНО

Заместитель начальника по
науке Главного управления
кадровой политики, учебных
заведений и науки

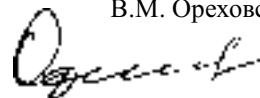
Н.И. Доста



13 июня 2000 г.

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель
министра здравоохранения
В.М. Ореховский



14 июня 2000 г.

Регистрационный № 41-0002

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЛАБОРАТОРНЫХ МАГНИТНЫХ СЕПАРАТОРОВ ТИПА «БЕЛСЕП» ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ОЧИЩЕННЫХ КЛЕТОЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ ИЗ КЛЕТОЧНЫХ СУСПЕНЗИЙ

Учреждение-разработчик: Витебский государственный медицинский университет

Авторы: Л.В. Тихонова, Ж.В. Хотетовская, д-р биол. наук О-Я.Л. Бекиш, д-р мед. наук Г.Я. Хулуп, д-р мед. наук А.П. Солодков

Рецензенты: д-р мед. наук М.П. Потапнев, канд. мед. наук А.Л. Усс

Основой для написания методических рекомендаций явились исследования, проведенные в Центральной научно-исследовательской лаборатории Витебского ордена Дружбы народов медицинского университета. В рекомендации описаны разработанные авторами современные методические подходы для выделения клеток-мишеней с помощью иммуномагнитной сепарации. Описаны и даны характеристики сепараторов «Белсеп-Л01» и «Белсеп-Л05», предложены методы выделения клеток из суспензии периферической крови для клинико-лабораторных и научных исследований.

Методические рекомендации предназначены для врачей иммунологов, гематологов, онкологов, вирусологов, сотрудников научно-исследовательских лабораторий, а также для врачей-лаборантов, занятых проблемами изоляции клеток крови и костного мозга, выделения бактерий и различных антигенов.

Методические рекомендации утверждены Министерством здравоохранения Беларуси в качестве официального документа.

ВВЕДЕНИЕ

Клеточная сепарация является одним из современных методов, активно применяемых в медицине для диагностических и лечебных целей. Это метод, благодаря которому одна или более клеточных субпопуляций могут быть выделены из суспензии. Он представлен различными методическими подходами: обработка моноклональными клеточными антителами + комплемент, моноклональными антителами + иммунотоксин (рицин), E-розеткодеплегция, элютриация, агглютинация пектином сои, иммуноадсорбция на колонке, иммуномагнитосепарация.

Метод иммуномагнитной сепарации является современным и наиболее эффективным методом, как более мягкая процедура очистки, при которой с одновременным удалением подавляющегося большинства клеток-мишеней сохраняется их жизнеспособность и жизнеспособность оставшейся популяции.

В Центральной научно-исследовательской лаборатории (ЦНИЛ) ВГМУ был разработан комплекс для иммуномагнитной сепарации клеток-мишеней из суспензии, состоящий из иммуноактивных микросфер (ИММС) и магнитного сепаратора (Белсеп-Л), который можно приобрести в ЦНИЛ ВГМУ, а также заказать в ПКП «Руслан», 210023, г. Витебск, пр-т Фрунзе, 27, ЦНИЛ, тел. (0212) 242509, факс (0212)372107.

В странах СНГ в настоящее время магнитные сепараторы не выпускаются, хотя потребность в них для использования в клинической практике постоянно возрастает, что частично компенсируется импортными поставками фирмами «Dyna», Норвегия, «Baxter», США, «Milteynyi Biotec», Германия, и отечественными — «Белсеп-Л», Беларусь.

Предложенный нами комплекс позволяет выделять из клеточных суспензий различные типы клеток по их мембранным антигенам в зависимости от выбора моноклональных антител:

– Т- и В-лимфоциты крови — для идентификации подвариантов острых и хронических лейкозов лимфоцитарного происхождения и определения иммунного статуса организма;

– стволовые клетки (CD34+);

– эпителиоциты;

– макрофаги;

– опухолевые клетки;

– ретикулоциты и др.

В настоящих методических рекомендациях изложены современные представления об использовании иммуномагнитной сепарации для выделения клеток-мишеней и дано обоснование оптимального использования предложенного нами комплекса.

ИММУНОМАГНИТНАЯ СЕПАРАЦИЯ

Необходимым условием проведения иммуномагнитной сепарации клеток-мишеней из суспензии является наличие:

- иммуномагниточувствительных микросфер (ИММС);
- моноклональных антител (МКАТ);
- магнитного сепаратора;
- лабораторного оборудования, посуды и растворов.

Магниточувствительные микросферы

Магниточувствительные микросферы (ММС) являются суперпарамагнитными монодисперсными полимерными частицами. Они содержат в своей структуре равномерно распределенный по объему магнитный материал, который под действием внешнего магнитного поля приобретает собственный магнитный момент (намагничивается до насыщения). Полимер тонким слоем покрывает частицы магнетита и определяет поверхностные характеристики микросфер (форму, размер).

Микросферы являются твердофазными носителями МКАТ. Они конъюгированы с панелью монополиклональных антител, обладающих специфической иммунологической восприимчивостью к определенным клеткам в зависимости от наличия на их поверхности типа кластеров дифференцировки — CD. Это дает возможность образовывать комплексы микросферы — клетка (КМК) посредством связи антиген-антитело, а наличие включения в них магнетита позволяет быстро и избирательно выделять КМК с помощью магнитного сепаратора.

Различают:

Первичнопокрытые ММС (ПММС). Готовы к использованию и добавляются непосредственно к клеточной суспензии. Они могут быть покрыты первичными МКАТ, которые прямо посажены на поверхность микросферы, или через вторичные антитела, специфические к первичным.

Вторичнопокрытые ММС (ВММС). Различные мышинные, крысиные или кроличьи поликлональные или моноклональные антитела, которые могут быть использованы в клеточной сепарации после инкубации их с ВММС.

Непокрытые активированные ММС (АММС). На АММС перед экспериментом могут быть посажены специфические поли- или моноклональные антитела и лиганды.

Типы иммуномагнитной сепарации

Прямой метод — при котором магнитные микросферы, первично покрытые МКАТ, добавляют непосредственно к суспензии клеток. В процессе инкубации образуются комплексы ИММС с клетками-мишенями. Эти комплексы могут быть удалены из суспензии с помощью магнитного сепаратора.

Непрямой метод — при этом методе клетки-мишени метятся первичными МКТ, которые добавляют к суспензии клеток. После периода инкубации свободные несвязавшиеся МКАТ отмывают центрифугирова-

нием и только затем к этой суспензии клеток добавляю магнитные микросферы, покрытые вторичными моно- или поликлональными антителами. В процессе инкубации ВММС связываются с клетками, мечеными первичными МКАТ. Эти комплексы также могут быть удалены с помощью магнитного сепаратора.

Таким образом, прямой метод более экономичен по использованию количества МКАТ и времени для проведения полной сепарации, однако непрямой метод более эффективен при одновременном выделении нескольких клеток-мишеней из суспензии.

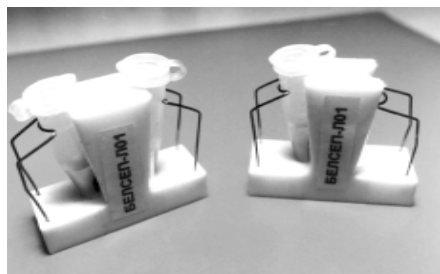
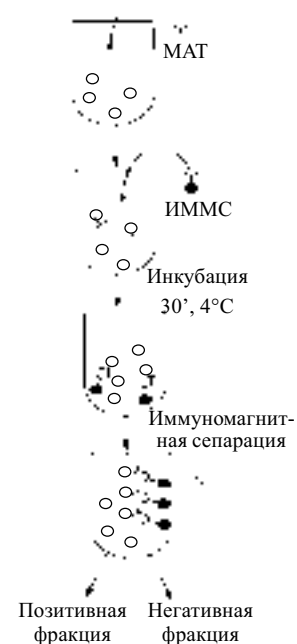
Позитивная сепарация — выделение и концентрация интересующих клеток из исследуемого объекта. Она используется обычно в прямом методе и позволяет выделять клетки с высокой степенью очистки.

Негативная сепарация — метод, с помощью которого клеточная популяция очищается путем удаления всех других типов клеток из исследуемого материала. Негативная изоляция может быть проведена как прямым, так и непрямым методом.

Прямой метод



Непрямой метод



«БЕЛСЕП Л-01»

- эффективность выделения клеток-мишеней 95–99%
- емкость задерживаемых клеток $1 \times 10^8/\text{мл}$
- объем обрабатываемой пробы 1,5 см
- индукция магнитного поля 0,5 Тл
- градиент индукции магнитного поля 30 Тл/м
- условия использования, хранения +4...+40°С

Устройство состоит из корпуса, выполненного из немагнитного материала, в котором имеются гнезда для установки двух пробирок.

На уровне нижней трети высоты пробирки в корпусе закреплен постоянный магнит цилиндрической формы, намагниченный вдоль оси. Пробирки закрепляются в гнездах пружинными прижимами.



«БЕЛСЕП Л-05»

- эффективность выделения клеток-мишеней 95–99%
- емкость задерживаемых клеток $1 \times 10^9/\text{мл}$
- объем обрабатываемой пробы 5 мл
- индукция магнитного поля 0,125 Тл
- условия использования, хранения $+4\dots+40^\circ\text{C}$

Сепаратор выполнен в виде настольного штатива из немагнитного материала, в который устанавливается до 10 пробирок объемом 10 мл каждая с обрабатываемым материалом.

Сепарация осуществляется магнитным полем постоянных магнитов, укрепленных в подвижной вставке. По окончании сепарации вставка с магнитами извлекается.

Работа устройств:

В гнезда корпуса устанавливают пробирки с разделяемыми биологическими продуктами, подлежащими сепарации. После определенной экспозиции, которая зависит от желаемой степени разделения и свойств разделяемых фракций, иммуномагнитный комплекс выделяется на стенках пробирок, а свободную фракцию отсасывают с помощью пипетки.

ОСНОВНОЙ ПРОТОКОЛ СЕПАРАЦИИ

В зависимости от объема полученной лейкосуспензии или моноклеарной взвеси с концентрацией, необходимой для проведения опыта, предлагаем использовать сепаратор «БЕЛСЕП-Л01» для объема меньше 2 мл и сепаратор «БЕЛСЕП-Л05» для объема больше 3–4 мл.

Растворы:

1. Фосфатно-солевой буфер (PBS), pH 7,4
 - $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,16 г
 - $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1,98 г
 - или $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,48 г
 - NaCl 8,10 г

Дистиллированной воды до 1 л

Довести pH до 7,4 гидроксидом натрия;

2. 0,9% NaCl;

3. Раствор Хенкса (HBSS);

4. PBS/BSA: добавить к PBS 0,1% бычьего сывороточного альбумина (конечная концентрация);

5. 0,02% NaN_3 (конечная концентрация) добавляется в PBS/BSA, используемый для отмывания клеточной суспензии и ИММС;

Все реагенты должны быть химически чистыми !

6. МКАТ для типирования клеток с последующим выделением не должны быть диагностическими, минимальная концентрация должна составлять 1 мг/мл;

7. ИММС (условия хранения и использования см. в инструкции по применению).

Оборудование и посуда: магнитный сепаратор, проточный цитофлуориметр, центрифуга, микроскоп, пробирки, колбы, пипетки.

Отмывка ИММС

Перед использованием ИММС (ПММС, ВММС, АММС) должны быть отмыты. Перенести ИММС в отмывочные пробирки с раствором PBS/BSA и тщательно ресуспензировать. Поместить пробирку в магнитный сепаратор (или магнит), выдержать в течение 2–3 мин и, не снимая пробирку с магнита, снять пипеткой отмывочный раствор. Процедуру повторить 3 раза.

Контролем качества отмывки ИММС служит бесцветный прозрачный раствор буфера и отсутствие в нем конгломератов ИММС при микроскопировании.

Определить концентрацию ИММС методом подсчета в камере Горяева.

Пример: изоляция клеток-мишеней прямым методом с использованием ПММС

1. Для выделения клеток-мишеней можно использовать лейкосуспензию или мононуклеары. Рекомендуемая концентрация клеток — 5–10 × 10⁶ кл/мл. При работе с лейкосуспензией предлагаем использовать сепаратор «БЕЛСЕП Л-05»;

2. Для удаления Т-лимфоцитов учитывается концентрация их в лейкосуспензии и рассчитывается абсолютное количество в выделенном объеме (допустим, концентрация в исследуемой суспензии Т-лимфоцитов — 70%, следовательно в 1 мл суспензии при концентрации клеток — 5 × 10⁶ кл/мл Т-лимфоциты составят 3,5 × 10⁶ кл;

3. Добавить в суспензию ПММС в концентрации 1:7 по отношению к клеткам-мишеням (3,5 × 10⁶ кл : 24,5 × 10⁶ ПММС, конъюгированные с МКАТ к антигену CD3);

4. Инкубировать в течение 30 мин при 4° С, периодически встряхивая;

5. Поместить пробирки с исследуемым материалом в гнезда сепаратора и выдержать достаточное для разделения время (2–5 мин);

6. Удалить отсепарированную негативную фракцию из пробирки, не вынимая последнюю из гнезда сепаратора;

7. Извлечь пробирку с позитивной фракцией (комплексы Т-лимфоцит-микросферы) из сепаратора и 2–3 раза отмыть их в PBS или в растворе Хенкса с использованием магнитного сепаратора.

В зависимости от поставленной цели использовать в дальнейшей работе позитивную или негативную фракцию.

Пример: изоляция клеток-мишеней непрямым методом с использованием ВММС.

1. Для выделения клеток-мишеней непрямым методом к лейкосуспензии или мононуклеарной взвеси (рекомендуемая концентрация клеток — $5-10 \times 10^6$ кл/мл) необходимо добавить соответствующие МКАТ (см. инструкцию по применению имеющихся у Вас МКАТ) и инкубировать пробы в течение 30 мин при $t = 4^\circ\text{C}$ в темноте;

2. После инкубации клетки отмывают 2 мл PBS/BSA, центрифугируя при 200 g в течение 5–7 мин;

3. К суспензии меченых клеток добавить ВММС в концентрации 1:7 по отношению к выделяемой популяции клеток;

4. Инкубировать в течение 30 мин при 4°C , периодически встряхивая;

5. Поместить пробирку с исследуемым материалом в гнезда сепаратора и выдержать достаточное для разделения время (2–5 мин);

6. Удалить отсепарированную негативную фракцию из пробирки, не вынимая последнюю из гнезда сепаратора;

7. Извлечь пробирку с позитивной фракцией (комплексы Т-лимфоцит-микросферы) из сепаратора и 2–3 раза отмыть их в PBS или в растворе Хенкса с использованием магнитного сепаратора.

Контролем качества сепарации является отсутствие в негативной фракции комплексов клетка-микросфера при микроскопии в камере Горяева.

Оценка эффективности выделения клеток-мишеней из клеточной суспензии

Для исследования эффективности выделения различных типов клеток из суспензии используют клетки, ресуспендированные в растворе Хенкса или PBS (рН 7,2–7,4) в концентрации $2-4 \times 10^6$ кл/мл.

Выделение мононуклеаров на градиенте плотности: 2 мл гепаринизированной крови (20 ЕД гепарина на 1 мл крови) смешивают с равным объемом среды Хенкса или PBS и осторожно наслаивают на градиент плотности фиколл — верографин ($r=1,077$) в центрифужной пробирке (3 объема лейкоцитарной массы на 1 объем градиента). Центрифугируют 35–40 мин (300 g) при комнатной температуре. Мононуклеарные клетки собирают из интерфазы пастеровской пипеткой, трижды отмывают раствором Хенкса (PBS), осадок ресуспендируют в растворе Хенкса (PBS), доводя концентрацию лимфоцитов до $2-4 \times 10^6$ /мл.

Жизнеспособность клеток до и после сепарации определяют методом окраски трипановым синим.

Учет результатов проводят методом проточной цитометрии или методом люминисцентной микроскопии.

Метод проточной цитометрии: $2-3 \times 10^6$ мононуклеарных клеток в 100 мкл PBS/BSA (рН 7,2–7,4) инкубируют с 20 мкл соответствующих МКАТ в течение 30 мин при $t = 4^\circ\text{C}$ в темноте. После инкубации клетки отмывают 2 мл PBS/BSA, центрифугируя при 200 g в течение 5–7 мин. Надосадок удаляют, а к осадку клеток добавляют 20 мкл F(ab)2-фрагментов Ig кролика против мышиных антител, меченых ФИТЦ (НПЦ

«МедБиоСпектр», Москва). Далее встряхивают пробирку с ингредиентами и инкубируют в течение 45 мин при 4°С в темноте, после чего клетки дважды отмывают 2 мл PBS центрифугированием при 300 g в течение 5–7 мин. Затем осадок ресуспендируют в 500 мкл 1% параформальдегида.

Для каждой пробы необходимы следующие контроли:

1. Контроль аутофлуоресценции — вместо МКАТ добавляют к суспензии клеток PBS;
2. Негативный контроль прокрашивания — вместо МКАТ — ФИТЦ-конъюгированный изотип антител в такой же концентрации, как и МКАТ;
3. Контроль на неспецифичность связывания — надосадочная жидкость, полученная после сепарации клеток, инкубированных с иммуномагнитными микросферами, не несущими моноклональных антител.

Суспензию меченых лимфоцитов измеряют на проточном цито-флуориметре. В каждом образце сосчитывают 2000–5000 клеток.

Метод люминисцентной микроскопии: 2–3×10⁵ клеток в 30 мкл раствора Хенкса инкубируют в пробирке объемом 1 мл с 20 мкл соответствующих моноклональных антител в течение 30 мин при комнатной температуре. После инкубации клетки отмывают 1 мл физиологического раствора, центрифугируя при 200 g в течение 2–3 мин. Надосадок удаляют, а к осадку клеток добавляют 20 мкл F(ab)2-фрагментов Ig кролика против мышиных антител, меченных ФИТЦ. Далее встряхивают пробирку с ингредиентами и инкубируют в течение 40 мин при комнатной температуре, после чего клетки дважды отмывают 1 мл физиологического раствора центрифугированием при 300 g в течение 10 мин. Затем осадок ресуспендируют в 30 мкл 0,9 % NaCl и взвесь клеток помещают на предметное стекло с 12 лунками из парафильма диаметром 7 мм, из расчета 1 капля на лунку. Предварительно стекло обрабатывают в течение 30–45 мин раствором поли-L-лизина (0,5 мг/мл) («Serva», Германия) во влажной камере (чашки Петри с фильтром) при 37°С. Взвесь клеток адсорбируют на стекле в течение 20 мин при комнатной температуре. Затем физиологический раствор из лунок осторожно отсасывают пипеткой и вносят в лунки 20 мкл 50% глицерина на 0,9% NaCl. Объектив люминисцентного микроскопа осторожно опускают в лунку на стекле и учитывают свечение, которое имеет форму окружности по мембране клетки. Определяют число светящихся клеток на 200 лимфоцитов. Реакцию можно учитывать в течение 24 ч после постановки. Используют два варианта контроля: 1 — клетки без добавления МКАТ и F(ab)2-фрагментов, меченных ФИТЦ; 2 — клетки без добавления МКАТ, обработанные F(ab)2-фрагментами, меченными ФИТЦ.

Оценку свечения производят визуально по четырехбалльной шкале:

- (++++) — очень яркая флуоресценция по периферии клетки, четко контрастирующая с темным фоном клетки;
- (+++)
- (++) — яркая флуоресценция периферии клетки, четко контрастирующая с темным фоном клетки;
- (++) — свечение клетки, четко контрастирующее с темным фоном;
- (+)
- (+) — слабое свечение клетки, клетка не контрастирует с темным фоном;
- (-)
- (-) — нет свечения.

Диагностическим критерием служит свечение (++).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Описанный метод быстро расширяет сферу своего использования. В лечебных целях иммуномагнитная сепарация клеток применяется при трансплантации костного мозга. С ее помощью проводят деплецию Т-лимфоцитов из аллотрансплантата костного мозга доноров, что используется для предупреждения развития реакции «трансплантат против хозяина» и выделения CD19, CD20, CD22 (HLA Class II) положительных В-лимфоцитов из периферической крови для последующего их типирования по системе HLA-DR с целью подбора доноров. Клеточная сепарация применяется для изоляции опухолевых клеток из аутологичного костного мозга при лечении гематологических заболеваний. Кроме того, иммуномагнитная сепарация начала широко использоваться в клиниках для выделения стволовых CD34+ клеток с целью последующего репопулирования КМ у больных гемобластозами и в случае тотального облучения.

В диагностических целях иммуномагнитная сепарация проводится для определения иммунного статуса организма, получения тканевых культур и постановки различных цитоиммунных реакций, в научно-исследовательских работах для специфического выделения клеток-мишеней по поверхностным CD-антигенам.

Магниточувствительные полимерные микросферы широко применяются для связывания поверхностных антигенов мембран клеток с целью сепарации как клеток, так и ферментов, микроорганизмов, вирусов, что является необходимостью в научной и клинической практике.

В заключение необходимо отметить, что описанный комплекс успешно используется в ЦНИЛ ВГМУ в процессе экспериментальной сепарации субпопуляций лимфоцитов из суспензии клеток периферической крови доноров. При проведении иммуномагнитной сепарации рекомендуем соблюдать следующие условия:

- гепаринизированная кровь 20 ЕД/мл, 2–8°C;
- разведение крови 1:1 в фосфатно-солевом буфере (PBS) или растворе Хенкса;
- соотношение клеток и микросфер для образования розеток — 1:7;
- концентрация клеток в суспензии до инкубации с ИММС должна составлять $5-10 \cdot 10^6$ кл/мл;
- жизнеспособность клеток должна быть не менее 95%;
- инкубация с МКАТ в течение 30 мин.

ОБОСНОВАНИЕ МЕДИКО-СОЦИАЛЬНОГО ПРЕИМУЩЕСТВА МЕТОДА ВЫДЕЛЕНИЯ КЛЕТОК-МИШЕНЕЙ ИЗ КЛЕТОЧНЫХ СУСПЕНЗИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЛАБОРАТОРНЫХ МАГНИТНЫХ СЕПАРАТОРОВ ТИПА «БЕЛСЕП»

В настоящее время трансплантация костного мозга или гемопоэтической стволовой клетки является методом выбора при лечении более 60 врожденных и приобретенных иммунодефицитных и гематологических заболеваний. Серьезным фактором, ограничивающим применение такой операции в клинике, является

развитие у 40–80% реципиентов реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ), причем у 1/3 из них это осложнение является причиной смерти. Вопросы профилактики развития острой РТПХ относятся к одним из самых сложных в трансплантологии кроветворных клеток. Претрансплантационная очистка клеток гемопоэтического трансплантата от Т-лимфоцитов (ТДК), ответственных за развитие РТПХ, представляется наиболее радикальным средством предупреждения как острой, так и хронической реакции. Теоретически успешная Т-деплегция должна приводить к уменьшению выраженности реакции «хозяин против трансплантата», устранять проявления РТПХ и исключить необходимость полной совместимости донора и реципиента.

Из множества методов ТДК, используемых для профилактики острой РТПХ при АТКМ наиболее эффективным является иммуномагнитная сепарация. Метод, активно применяемый в медицине для диагностических и лечебных целей, как более мягкая процедура очистки, при которой с одновременным удалением подавляющегося большинства клеток-мишеней сохраняется их жизнеспособность и жизнеспособность оставшейся популяции.

Однако в странах СНГ в настоящее время магнитные сепараторы не выпускаются, хотя потребность их для использования в клинической практике постоянно возрастает, что частично компенсируется импортными поставками фирмами «Dynal», Норвегия, «Baxter», США, «Milteyni Biotec», Германия. В ЦНИЛ ВГМУ был разработан комплекс для иммуномагнитной сепарации клеток-мишеней из суспензии, состоящий из иммуноактивных микросфер (ИММС) и магнитного сепаратора. Этот комплекс уникален и не имеет аналогов как в Республике Беларусь, так и в странах СНГ.

Разработанная методика сепарации клеток-мишеней может быть использована для диагностических и научно-исследовательских целей и имеет все перспективы для широкого внедрения в онкологии, трансплантологии, гематологии, иммунологии, генной инженерии и научно-исследовательской работе в области медико-биологических наук.