

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ В.А. Ходжаев

03.12. 2010 г.

Регистрационный № 115-1010

**ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ТРАНСЛОКАЦИИ t(9;22) (q34;q11) У ПАЦИЕНТОВ
С ХРОНИЧЕСКИМ МИЕЛОИДНЫМ ЛЕЙКОЗОМ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

УО «Гомельский государственный медицинский университет»

АВТОРЫ:

Данченко М.Н., к.м.н. Воропаев Е.В., Волочник Е.В., Козарь И.Н.

Гомель 2010

ПЕРЕЧЕНЬ ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ПЦР	— полимеразная цепная реакция
СЦИ	— стандартное цитогенетическое исследование
ХМЛ	— хронический миелоидный лейкоз
FISH	— флуоресцентная <i>in situ</i> гибридизация

Хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ) — клональное миелопролиферативное заболевание, которое составляет 15–20% всей совокупности лейкозов у взрослых и относится к наиболее тяжелым заболеваниям, приводящим к инвалидности. Заболеваемость ХМЛ составляет 1–1,5 случая на 100000 взрослых в год. Средний возраст больных на момент установления диагноза — 50 лет. У детей заболевание встречается редко.

При ХМЛ в полипотентных стволовых клетках в результате реципрокной транслокации t(9; 22)(q34; q11) образуется химерный ген BCR-ABL, кодирующий белок с повышенной тирозинкиназной активностью. Диагноз ХМЛ подтверждается определением Ph-хромосомы (филадельфийская хромосома — атипичная 22 хромосома), которая выявляется у 95% больных, в остальных случаях происходят более сложные хромосомные нарушения с вовлечением не менее 3-х хромосом с обязательным участием 9 или 22-й. Определение данного маркера может использоваться не только для постановки диагноза, но и для оценки результатов лечения.

Введение в терапевтическую практику новых препаратов, ингибирующих тирозинкиназу, привело к увеличению продолжительности жизни больных и улучшению ее качества. Однако некоторые больные обладают резистентностью к получаемой терапии. Поэтому определение полноты цитогенетического ответа как одного из показателей успешности проведенной терапии и своевременное выявление резистентных клонов клеток позволяет изменить тактику лечения больных.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Инструкция разработана для цитогенетического подтверждения диагноза ХМЛ и оценки полноты цитогенетического ответа после лечения с учетом медицинских, социальных и экономических аспектов.

Область применения: онкогематология.

Уровень внедрения: медицинские учреждения, проводящие диагностику и лечение онкогематологической патологии.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАГЕНТОВ, РАСХОДНЫХ МАТЕРИАЛОВ

Перечень необходимого оборудования:

1. Автоматические пипетки переменного объема.
2. Баня водяная с датчиком температуры.
3. Ламинарный шкаф.

4. Пинцет.
5. Термостат.
6. Флуоресцентный микроскоп с набором фильтров (для красителя DAPI спектр возбуждения/излучения должен быть — 358 нм/461 нм; FITC — 495 нм/520 нм; Texas Red 596 нм/615 нм).

7. Часы

Реактивы и расходные материалы:

1. 0,1M NaH₂PO₄.
2. 0,1M HCl
3. 0,1M KH₂PO₄ или Na₂HPO₄.
4. 37% формальдегид.
5. 96% спирт.
6. KCl.
7. Na₂HPO₄ безводный.
8. NaCl.
9. Tris.
10. Антибиотик и антимикотик.
11. Гипотонический раствор (0,5 % раствор KCl).
12. Глютамин.
13. Дистиллированная вода.
14. ДНК-зонд.
15. Емкости для окраски предметных стекол — например, емкость Коплина.
16. Иммерсионное масло для флуоресцентной микроскопии (fluorescence free).
17. Коллемеид.
18. Краситель DAPI.
19. Краситель Гимза.
20. Культуральная среда RPMI-1640.
21. Наконечники с фильтром к автоматическим пипеткам переменного объема в диапазоне от 5 до 100 мкл.
22. Покровные стекла размером 18x18.
23. Предметные стекла.
24. Пробирки с гепарином.
25. Раствор Карнуа (метанол и ледяная уксусная кислота в соотношении 3:1).
26. Резиновый клей.
27. Стерильные пастеровские пипетки.
28. Стерильные пробирки для культивирования.
29. Центрифужные пробирки.
30. Цитрат натрия.
31. Эмбриональная телячья сыворотка.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Не выявлены

Взятие материала

Костный мозг берут по стандартной методике в стерильную пробирку с гепарином. Материал доставляют сразу же в лабораторию, где допускается его хранение при комнатной температуре в течение 6 ч или суток в холодильнике при температуре $\sim +4^{\circ}\text{C}$.

Культивирование

Приготовить культуральную смесь в ламинарном шкафу из расчета на 1 исследование:

Культуральная среда RPMI-1640 — 5 мл

Эмбриональная телячья сыворотка — 1 мл

Глютамин — 0,1 мл

Антибиотик и антимикотик — 0,1 мл

В стерильную культуральную пробирку с подогретой средой до 37°C внести 0,3 мл костного мозга. Перемешать стерильной пипеткой и инкубировать в термостате при температуре 37°C в течение 15 мин при краткосрочном методе посадки.

Для прерывания клеточного деления на стадии метафазы в клеточную культуру добавить 2 капли колцемида, перемешать легким встряхиванием и инкубировать в термостате при температуре 37°C в течение 45 мин.

При культивировании в течение 24 часов колцеמיד вносится через 20 часов и инкубируется 30 минут.

На следующем этапе, который называют «гипотонический шок», добиваются разрыва межхромосомных связей вследствие разницы осмотического давления внутри и снаружи клеток при добавлении раствора соли натрия. В результате этого хромосомы в метафазной пластинке лежат разрозненно друг от друга, что позволяет проводить их дифференцировку. Для этого необходимо перенести культуру в центрифужные пробирки и центрифугировать 10 минут при скорости 1000 об/мин. Удалить супернатант пипеткой, не касаясь стенок пробирки, оставив около 1 мл супернатанта.

Ресуспендировать. Добавить по каплям нагретый до 37°C гипотонический раствор (0,5% раствор KCl), осторожно встряхивая, довести до 10 мл и инкубировать в течение 8–10 мин при температуре 37°C .

Центрифугировать 10 минут при скорости 1000 об/мин. Удалить супернатант пипеткой, не касаясь стенок пробирки, оставив около 1 мл супернатанта.

Ресуспендировать. Для сохранения структуры хромосом культуру фиксируют: добавить по каплям охлажденный до 20°C раствор Карнуа пока объем не достигнет 10 мл и аккуратно перемешать при помощи пипетки. Оставить на 10 мин при температуре $+4^{\circ}\text{C}$. Центрифугировать 10 мин при скорости 1000 об/мин, удалить супернатант, оставив около 1 мл. Отмыть раствором Карнуа несколько раз.

Раскапать осадок на обезжиренные влажные стекла на расстоянии вытянутой руки (чистые обезжиренные стекла хранятся в холодильнике в дистиллированной воде при температуре $\sim +4^{\circ}\text{C}$).

Полученные препараты можно использовать для цитогенетического исследования и FISH.

Проведение цитогенетического исследования:

Для цитогенетического исследования провести дифференциальную G-окраску.

Высушенные препараты выдержать на ровной металлической поверхности, нагретой до температуры 56 °С 2 сут.

За 1 сут до проведения окраски приготовить растворы фосфатного буфера: буфер I для приготовления раствора трипсина, буфер II для приготовления краски.

Фосфатный буфер I (pH 7,2–7,4)

8,0 г NaCl

0,725 г Na₂HPO₄ безводный

0,4 г KCl

0,12 г KH₂PO₄

доводим до 1 л дистиллированной водой.

Неиспользованный буфер хранить при комнатной температуре до изменения цвета, появления осадка или изменения pH.

Фосфатный буфер II (pH 6,8)

25 мл 0,1M KH₂PO₄ или Na₂HPO₄

25 мл 0,1M NaH₂PO₄

Неиспользованный буфер хранить при комнатной температуре до изменения цвета, появления осадка или изменения pH.

Использованный буфер повторно для проведения исследования не пригоден.

Приготовить раствор трипсина: к 100 мл буфера I добавить ~ 0,05 г трипсина кристаллического и инкубировать при температуре 37 °С в течение 60 мин. Затем его в емкости для окрашивания стекол поместить на водяную баню при температуре 30 °С.

Фосфатный буфер I в емкости для окрашивания стекол поставить в морозильную камеру (температура ~ -15 °С) до образования кристаллов льда, консистенция должна быть такой, чтобы в буфер можно было погрузить стекло.

Приготовить краску: к 100 мл фосфатного буфера II добавить 5 мл красителя Гимза.

Процедура окраски: перед покраской достать фосфатный буфер I из морозильной камеры; препарат на 10 с внести в раствор трипсина, находящийся в водяной бане при температуре 30 °С. Перенести стекло на 40 с в ледяной фосфатный буфер I.

Выдержать препараты 6–10 мин в красителе Гимза при комнатной температуре. Промыть дистиллированной водой. После вертикальной сушки микроскопировать.

Проведение FISH-анализа:

Работу необходимо проводить в вытяжном шкафу.

Приготовление реактивов:

Буфер I для FISH (0,1M Tris/HCl (pH 7,8))

121 мл Tris

34 мл H₂O

5 мл 0,1M HCl

Не использованный буфер можно хранить в течение 1 мес при температуре 2–8 °С.

Буфер II для FISH (20xSSC с детергентом (pH 7,0))

175,3 г NaCl

88,2 г цитрата натрия

1 л дистиллированной воды (в качестве детергента можно использовать додецилсульфат натрия — SDS, тритон). Хранить в течение 1 мес при температуре 2–8 °С. Перед использованием раствор развести с дистиллированной водой в 20 раз (1 часть буфера и 19 частей дистиллированной воды). Не использованный разведенный буфер можно хранить в течение 1 мес при температуре 2–8 °С.

Приготовить растворы 70, 85% этилового спирта.

Приготовить раствор 3,7% формальдегида: смешать 37% раствор формальдегида с разведенным дистиллированной водой буфером I для FISH.

При использовании коммерческих наборов готовим реактивы согласно инструкции производителя.

I день

Разлить необходимые реактивы в емкости для окраски препаратов: одна емкость с раствором 3,7% формальдегида; две емкости с разведенным дистиллированной водой буфером I для FISH; по одной емкости (всего 3) с раствором этилового спирта с концентрацией 70, 85, 96%.

При исследовании реактивы должны быть комнатной температуры.

Шаг 1. Подготовка препаратов

Под световым микроскопом с опущенным конденсором найти на препарате участок наиболее подходящий для постановки реакции (клетки должны лежать отдельно друг от друга) и отметить его.

Образцы фиксировать в течение 2 мин при комнатной температуре в 3,7% растворе формальдегида. Отмыть дважды по 5 мин в разведенном буфере I для FISH комнатной температуры. Дегидратировать по 2 мин в растворах этилового спирта концентрации 70, 85 и 96%.

Высушить образцы на воздухе в вертикальном положении.

Шаг 2. Гибридизация с ДНК-пробой.

Далее все манипуляции проводить в затемненной комнате.

ДНК-пробу осадить центрифугированием и перемешать на вортексе. Нанести на отмеченный участок 7–7,5 мкл ДНК-пробы. Накрыть покровным стеклом размером 18x18 мм, избегая образования пузырей воздуха. Края покровного стекла заклеить резиновым клеем.

Образцы положить на 5 минут на разогретую до 82 °С ($\pm 2^\circ$) металлическую поверхность (можно использовать электрическую плитку).

Инкубировать во влажной камере в термостате в течение 16–20 ч при температуре 45 °С.

II день

Приготовить две емкости для окраски препаратов с разведенным буфером II для FISH: одна комнатной температуры; вторая прогревается в водяной бане до 65 °С (± 2 °С); две емкости с разведенным буфером I для FISH; по одной емкости (всего 3) с этиловым спиртом с концентрацией 70, 85 и 96%.

Достать образцы из термостата и сняв покровное стекло, погрузить в емкость с разведенным буфером II для FISH комнатной температуры на 5 мин.

Инкубировать препараты в емкости с разведенным буфером II для FISH, находящейся в водяной бане, в течение 10 мин.

Двукратно отмыть образцы по 3 мин в разведенном растворе буфера I для FISH при комнатной температуре.

Дегидратировать по 2 мин в растворах этилового спирта концентрацией 70, 85 и 96%.

Высушить образцы на воздухе.

На отмеченный участок на препарате нанести 10 мкл красителя DAPI, накрыть покровным стеклом размером 18x18 мм, избегая образования пузырей воздуха. Края заклеить резиновым клеем.

Через 15 мин препараты готовы к просмотру. Повторный анализ препаратов можно проводить в течение нескольких месяцев при условии хранения препаратов в морозильной камере.

Интерпретацию результатов проводить с учетом конструкции используемого зонда согласно рекомендациям производителя. Например, при использовании двухцветных ДНК-зондов, определяющих разрыв в BCR-гене, локализованном на 22-й хромосоме, у которых зонд, комплементарный 3`концу, имеет метку FITC (зеленый сигнал), а зонд, комплементарный 5`концу, Texas Red (красный сигнал); результат учитывают следующим образом:

Считать, что ядро не содержит разрыв гена BCR, если зеленый и красный сигнал **лежат рядом и их наложение друг на друга дает желтое свечение**. В нормальном интерфазном ядре должно присутствовать две красные метки, совмещенные с двумя зелеными как показано на рис. 3.

Изображение, представленное на рис. 1 получено с помощью камеры, установленной на микроскопе с фильтром, светопропускающая способность которого позволяет производить детекцию свечения флуорохрома FITC.

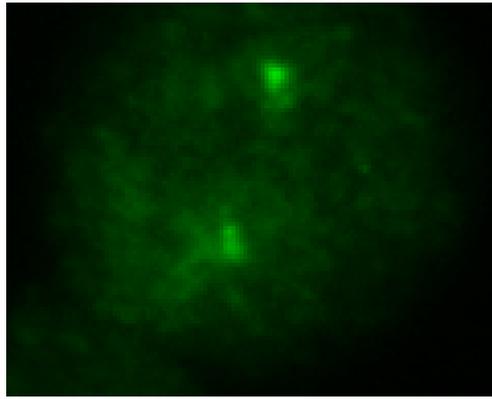


Рис. 1. Изображение, полученное при микроскопии с фильтром, светопропускающая способность которого позволяет производить детекцию свечения флуорохрома FITC

Изображение, представленное на рис. 2, получено с помощью камеры, установленной на микроскопе с фильтром, светопропускающая способность которого позволяет производить детекцию свечения флуорохрома Texas Red.

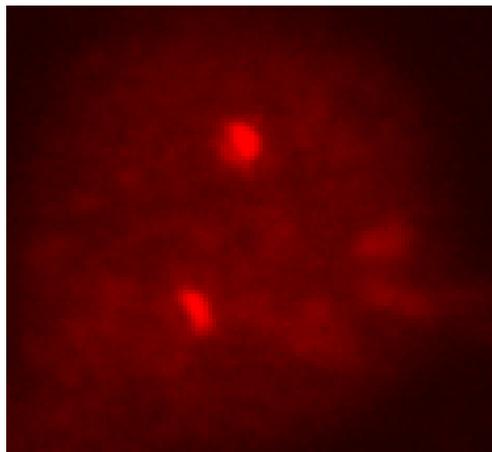


Рис. 2 Изображение, полученное при микроскопии с фильтром, светопропускающая способность которого позволяет производить детекцию свечения флуорохрома Texas Red

На рис. 3 продемонстрировано результирующее изображение, полученное при помощи программного обеспечения путем наложения снимков одного и того же поля зрения при смене фильтров в микроскопе.

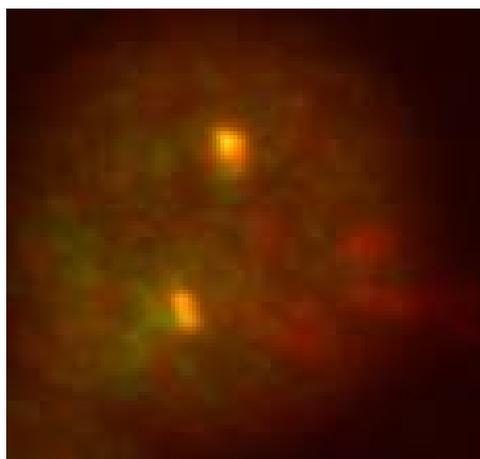


Рис. 3 Результирующее изображение

При наличии в клетке реципрокной транслокации результирующее изображение выглядит так, как показано на рис. 4 (синими линиями ядро условно разделено на сегменты). Нормальная хромосома дает желтое свечение за счет наложения красного и зеленого сигналов (рис. 4, правый нижний сегмент). Разрыв 22-й хромосомы на участке VCR-гена выглядит как отдельно лежащие сигналы, расстояние между которыми превышает 2 диаметра сигнала. Как правило, эти сигналы лежат в различных сегментах (рис. 4, левые верхний и нижний сегменты). Суммарное изображение получено при использовании двух фильтров (для FITC, Texas Red). Такое же изображение можно наблюдать при микроскопировании с использованием комбинированного фильтра.

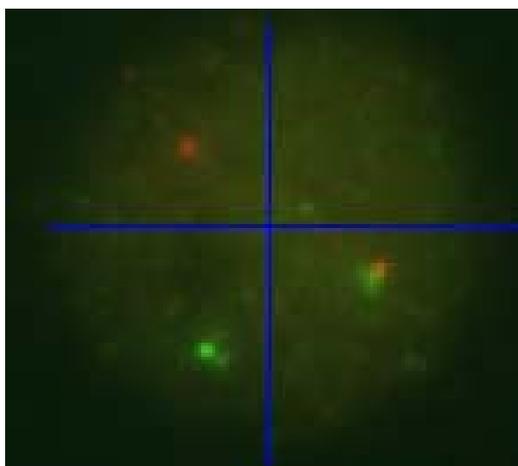


Рис. 4. Транслокация-положительная клетка

РЕКОМЕНДАЦИИ

Для первичного обследования больных предпочтительно использовать стандартное цитогенетическое исследование, позволяющее выявлять все нарушения кариотипа. Для оценки полноты цитогенетического ответа после терапии согласно общепринятым международным критериям ремиссии ХМЛ

(Хьюстоновские критерии) необходимо анализировать не менее 20 метафаз. Результат трактовать следующим образом:

полный цитогенетический ответ — клетки с филадельфийской хромосомой отсутствуют;

частичный цитогенетический ответ — 5–34% метафаз составляют Ph⁻-позитивные клетки;

минимальный цитогенетический ответ — 35–95% метафаз составляют Ph⁻-позитивные клетки;

отсутствие цитогенетического ответа — все клетки содержат Ph⁻ хромосому;

большой цитогенетический ответ — включает полный и частичный.

Эксперты European LeukemiaNet рекомендуют проводить цитогенетическое исследование больным, получающим ингибитор тирозинкиназы, в следующей последовательности:

на момент установления диагноза, 3, 6-й мес. приема препарата;

затем каждые 6 мес до достижения полного цитогенетического ответа, а после каждые 12 мес, если нет возможности обеспечить регулярный молекулярный мониторинг;

после неудачи лечения (первичная или вторичная резистентность);

возникновение необъяснимой анемии, лейко- или тромбоцитопении.

При достижении полного цитогенетического ответа либо при недостаточном количестве метафаз используется метод FISH с подсчетом не менее 200 ядер.

Данные методические рекомендации могут быть применены для выявления и мониторинга терапии других аналогичных опухолей.

ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ

Трудности при получении и обработке результатов могут возникнуть в следующих случаях:

- неправильное взятие, транспортировка и хранение материала.
- фильтры флуоресцентного микроскопа не соответствуют физическим характеристикам красителя, используемого в зонде;
- использовали реагенты с истекшим сроком годности или выдерживали их длительное время при неправильных условиях хранения;
- использовали неточно дозированные реагенты;
- нарушали методику проведения исследований (время инкубации, температурный режим и т. д.).