

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра



В.В. Колбанов

13 февраля 2003 г.

Регистрационный № 125–1102

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНДИВИДУАЛЬНОЙ
ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К ХИМИОТЕРАПИИ
ПРИ В-КЛЕТОЧНОМ ХРОНИЧЕСКОМ
ЛИМФОЦИТАРНОМ ЛЕЙКОЗЕ**

Инструкция по применению

Учреждение-разработчик: НИИ гематологии и переливания крови

Авторы: А.И. Свирновский, К.В. Сальников, В.В. Савостьянов,
Т.В. Авхукова, Т.А. Евстратенко, И.Б. Тарас, А.В. Бакун, С.В. Шелег

ВВЕДЕНИЕ

Хроническая лимфоцитарная лейкемия/лимфома из малых лимфоцитов (МЛЛ/ХЛЛ) (коды: для ХЛЛ — С91.1 и 9823/3 по МКБ-10 и МКБ-О соответственно, для МЛЛ/ХЛЛ — 83.0 и 9670/3 соответственно) является опухолевым заболеванием лимфоидной ткани, при котором происходит накопление зрелых В-клеток, избежавших запрограммированной клеточной гибели и подвергшихся аресту в G₀ фазе клеточного цикла.

При постановке диагноза ХЛЛ количество лимфоцитов в крови превышает $10 \times 10^9/\text{л}$, хотя диагноз является вероятным при обнаружении меньшего числа лимфоцитов в крови, но при соответствующих морфологии и иммунофенотипе клеток. Диагноз МЛЛ устанавливается в тех случаях, в которых морфологические изменения в тканях соответствуют таковым при ХЛЛ при отсутствии лейкоэмических изменений в крови и в костном мозге.

В-клеточные ХЛЛ составляют около 90% всех ХЛЛ, на долю МЛЛ/ХЛЛ приходится менее 7% от общего числа неходжкинских лимфом. Возраст больных обычно превышает 50 лет, мужчины болеют приблизительно в 2 раза чаще женщин.

К клиническим признакам заболевания относятся слабость, потливость, аутоиммунная гемолитическая анемия, инфекции, спленомегалия, гепатомегалия, лимфаденопатия, экстранодальные инфильтраты, хотя у значительной части пациентов эти симптомы отсутствуют, особенно на начальных стадиях. Для клинического стадирования заболевания используют шкалы Rai (0-IV) и Binet (A-C) (часто объединенные).

Инфильтрация лимфоцитами обнаруживается в костном мозге, лимфатических узлах, печени, селезенке. Возможна экстранодальная локализация инфильтратов. Клеточным субстратом заболевания являются в определенной степени мономорфные круглой формы В-лимфоциты, присутствующие в периферической крови, костном мозге, лимфатических узлах, селезенке и имеющие нередко относительно небольшие размеры. Эти так называемые малые лимфоциты часто заметно больше по размерам, чем нормальные малые лимфоциты, круглое ядро содержат глыбчатый хроматин и иногда ядрышко. На этом фоне встречаются более крупные пролимфоциты

с менее глыбчатой структурой хроматина, ядрышками, более широким ободком цитоплазмы и большие параиммунобласты с круглым или овальным ядром, диспергированным хроматином, ядрышками и слегка базофильной цитоплазмой. При наличии в крови более 10%, но менее 55% пролимфоцитов диагностируется вариант ХЛЛ с избытком пролимфоцитов. Если количество пролимфоцитов превышает 55%, то диагностируется В-клеточная пролимфоцитарная лейкемия. Изредка возможны появление небольшого количества клеток с расщепленными ядрами, плазмацитоидная дифференцировка клеток и наличие М-компонента, трансформация в диффузную крупноклеточную В-лимфому (синдром Рихтера).

Архитектоника лимфатических узлов стерта, светлые зоны (псевдофолликулы, которые являются центрами размножения, хотя пролиферативная активность низкая), содержащие более крупные клетки (пролимфоциты и параиммунобласты), выявляются на темном фоне мелких клеток. Инфильтрация костного мозга имеет нодулярный, интерстициальный или диффузный характер, псевдофолликулы встречаются реже, чем в лимфатических узлах.

Лейкемические клетки слабо экспрессируют IgM или IgM и IgD, CD5, CD19, CD20 (слабо), CD22 (слабо), CD79a, CD23, CD43, CD11c (слабо), в части случаев CD38. Специфичность поверхностных Ig во многих случаях направлена против собственных антигенов.

Гены тяжелых и легких цепей перестроены. В зависимости от отсутствия или наличия мутаций варибельной области гена тяжелых цепей Ig выделяют два типа ХЛЛ: происходящих из нативных В-лимфоцитов (еще не контактировали с антигеном) и из В-лимфоцитов герминативных центров (соответствуют В-клеткам памяти). Хромосомные аберрации обнаружены в 80% случаев при использовании FISH-анализа интерфазных хромосом (трисомия 12, делеции 13q14, 11q22–23, реже 6q21 и 17p13).

Таким образом, клинические, морфологические, биохимические, иммунологические, цитогенетические исследования свидетельствуют о гетерогенности заболевания.

Течение заболевания длительное, однако оно считается неизлечимым, несмотря на возможность получения в настоящее время длительных ремиссий. В качестве прогностических факторов по

мере возможности используют стадию заболевания, морфологические особенности клеток, время удвоения популяции клеток, иммунофенотипические, цитогенетические, молекулярно-генетические и другие биологические особенности клеток. Менее благоприятными являются поздние стадии заболевания по Rai и Binet, увеличение количества пролимфоцитов и появление бластных клеток, диффузная инфильтрация костного мозга, время удвоения популяции лимфоцитов менее 12 мес., трисомия 12, делеция 11q22–23, аномалия хромосомы 17, отсутствие мутаций в вариабельной области гена тяжелых цепей, наличие мутаций p53, дисбаланс между про- и антиапоптотическими генами семейства BCL-2, экспрессия CD38, FMC7, отсутствие экспрессии CD25, повышение экспрессии Ig, ингибитора циклинзависимой киназы, снижение экспрессии молекул адгезии CD6, CD11a, CD11c, CD18, CD 31, CD39, CD45, CD48, CD58, низкая экспрессия костимулирующих молекул B7 (CD80 и CD86), нарушение экспрессии других иммунорегулирующих молекул CD40R, CD27, CD79b.

В реализации эффектов противоопухолевой терапии ведущая роль принадлежит индукции апоптотических процессов и преодолению лекарственной резистентности лейкоэмических клеток. Определение чувствительности лейкоэмических клеток к терапевтическим воздействиям *in vitro* является существенным компонентом индивидуализации типовой терапии (стадирование заболевания на основе изучения биологии лейкоэмической клетки, выбор препаратов для лечения, оптимизация терапии без ее интенсификации, мониторинг в процессе терапии), даже если невозможным оказывается проведение всего комплекса исследований, необходимых для прогнозирования течения заболевания.

Оценка чувствительности клеток к разнообразным факторам проще всего осуществляется с помощью методов определения интенсивности апоптотических процессов в клетке и при использовании тестов определения цитотоксичности. В качестве наиболее доступных тестов в клинических условиях используются:

1. Метод флуоресцентной микроскопии клеток после окраски их акридиновым оранжевым и анализа конденсации хроматина для определения количества апоптотических клеток.

2. Цитотоксический тест с метилтиазолтетразолием (МТТ-тест) для определения фракции жизнеспособных клеток по сохранению их метаболической активности.

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.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА АПОПТОТИЧЕСКИХ КЛЕТОК

Апоптоз (запрограммированная клеточная гибель) — это непатологический процесс, приводящий через ряд последовательных событий на генетическом и эпигенетическом уровнях к смерти клетки. В каждой клетке существуют сигнальные и эффекторные системы программы апоптоза, активируемые внешними или внутренними стимулами. Апоптоз является одним из фундаментальных механизмов поддержания гомеостаза на тканевом и системном уровнях. Сбои в реализации программы апоптоза в клетках лежат в основе патогенеза и прогрессии ряда заболеваний, включая злокачественные новообразования. Вместе с тем значительная часть терапевтических воздействий при опухолевых заболеваниях, в том числе и при лейкомиях и лимфомах, направлена на реализацию апоптотической программы в клетке.

Апоптотическая гибель клетки сопровождается различной степени специфичности изменениями на молекулярном, органелльном и клеточном уровнях, для регистрации которых в настоящее время предложено много методов.

Протеолитический каскад апоптотических протеаз является эффекторным звеном реализации процесса запрограммированной клеточной гибели. Считается, что после активации каспазного каскада процесс клеточного самоубийства становится неизбежным и необ-

ратимым. Субстратом для каспаз являются ядерные протеины, чья функция заключается в репарации и репликации ДНК, сплайсинге РНК (полиаденозиндифосфатрибозил полимеразы, ДНК-зависимая протеинкиназа, топоизомераза I), а также компоненты цитоплазмы и цитоскелета. Морфологические изменения, характерные для апоптотических клеток, обусловлены именно этим процессом.

Одним из таких морфологических признаков апоптоза является изменение ядерной морфологии, проявляющееся в конденсации и фрагментации ядерного хроматина. На первых этапах происходит образование конденсированных участков хроматина в перинуклеарной области (в виде серпа или лошадиной подковы). По мере развития этого процесса возможно появление областей конденсированного хроматина в центральной области ядра. Участков конденсации может быть несколько. Затем происходит образование так называемых «апоптотических тел» (изолированные ядерные фрагменты вместе с содержимым цитоплазмы, включающие интактные органеллы и окруженные фрагментами плазматической мембраны).

Показания к применению

1. Определение способности к апоптозу лимфоцитов из костного мозга или периферической крови после извлечения их из организма и культивирования *in vitro* (так называемый спонтанный апоптоз) — оценка проапоптотического потенциала клеток.
2. Определение чувствительности лимфоцитов к химио- и лучевой терапии.
3. Выбор наиболее адекватного для терапии цитостатического препарата или их сочетания.
4. Контроль эффективности терапии.

Перечень необходимого оборудования, материалов, реактивов, лекарственных средств

Перечень необходимого оборудования

1. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки — ГОСТ 1770–74 (ИСО 1042–83, ИСО 4788–80).
2. Пипетки стеклянные на 1, 2, 5, 10 мл.
3. Автоматические дозаторы на 40, 200, 1000 мкл.
4. Наконечники для автоматических дозаторов (Sarstedt, США).

5. 24-луночные планшеты (Flow Lab., Великобритания).
6. Установка обеспыливания (ламинар для клеточных культур) УО-БГ, допускается бокс с ламинарным током воздуха.
7. Центрифуга ОПн-5.
8. Термостат ТС-80, допускается инкубатор с подачей CO₂.
9. Источник CO₂.
10. Источник для облучения клеток (при необходимости).
11. Центрифуга ОПн-3У 4.2.
12. Микроскоп «Люам И2».
13. Предметные стекла.
14. Покровные стекла.
15. Пробирки Эппендорф 1,5 см³.
16. Набор ареометров общего пользования (Минприбор, СССР, допускается другой).
17. Холодильники, морозильник (-20° С).
18. Сушительно-стерилизационный шкаф ССШ-80.
19. Эксилятор стеклянный с краном, диаметр 190 мм.
20. Микроскоп световой (×200–400) для подсчета клеток в камере Горяева.
21. Камера Горяева.
22. Счетчик Адамса для подсчета клеток.
23. Пробки резиновые ПР 27, 24, 20, 19, 18, 16, 14,5 — ГОСТ 7852–76.

Перечень реактивов

1. Фиколл-400 (Pharmacia, Швеция).
2. Верографин 76 или 60% (Spofa, Чехия).
3. Гепарин, стерильный раствор для инъекций, в 1 мл 5 000 ЕД (АО «Белмедпрепараты»).
4. Хлорид натрия, изотонический раствор 0,9% для инъекций.
5. Среда RPMI-1640 (Flow Lab., Великобритания).
6. Эмбриональная телячья сыворотка (Sigma, США), допускается использование сыворотки крови эмбриональной (КРС, Минздрав РБ, ГУ НИИЭМ).
7. L-глутамин (Sigma, США).
8. Пенициллин.
9. Стрептомицин.

10. Параформальдегид (Sigma, США).
11. Фосфатный буферный раствор Дюльбекко (Sigma, США).
12. Акридиновый оранжевый (Sigma, США).
13. Лекарственные препараты.

Технология использования метода

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 бидистиллированной 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. Раствор для стабилизации крови: 125 мкл раствора гепарина 5 000 ЕД/мл + 2,375 мл раствора среды RPMI-1640.

5. Основной раствор антибиотиков: пенициллин 100 000 ЕД/мл + стрептомицин 100 мг/мл.

6. Растворы лекарственных препаратов в концентрациях, соответствующих терапевтическим.

7. Полная питательная среда: среда RPMI-1640, содержащая 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 1% L-глутамина, 0,1% смеси антибиотиков.

8. Раствор параформальдегида 2% в фосфатном буферном растворе.

9. Фосфатный буферный раствор Дюльбекко: 9,6 г буфера + 1000 мл дистиллированной воды.

10. Раствор акридинового оранжевого 2 мг/мл.

Выделение клеток

В стерильные флаконы для взятия крови внести 1 мл раствора гепарина в среде и 9 мл венозной крови, перемешать. Кровь развести физиологическим раствором в соотношении 2:1. Разведенную

кровь медленно наслоить в пробирке на фиколл-верографин (2 мл фиколл-верографина и 8 мл крови). Центрифугировать в течение 30 мин при 1500 об./мин. Лимфоциты образуют белое кольцо на поверхности фиколл-верографина. Пипеткой с тонким концом собрать кольцо лимфоцитов и перенести в отдельную пробирку. Отмыть лимфоциты путем добавления физиологического раствора и центрифугирования при 1200 об./мин в течение 15 мин. Супернатант слить, осадок ресуспендировать при добавлении физиологического раствора. Центрифугировать в течение 10 мин при 1200 об./мин. Осадок использовать как источник клеток.

Культивирование клеток

Клетки после выделения и отмывания физиологическим раствором хлорида натрия, как описано выше, поместить в среду для культивирования RPMI-1640, содержащую 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 1% глутамина, 0,1% смеси пенициллина и стрептомицина. Концентрация клеток в среде — 1–1,2 млн/мл. С помощью мерной пипетки перенести по 1 мл клеточной взвеси в 24-луночный планшет. Исследуемые препараты внести в виде раствора в концентрациях, предусмотренных схемой исследования (для каждой концентрации используют три лунки). В три лунки внести растворитель. Планшет поместить в эксикатор с увлажненной атмосферой и 5% CO₂ (в эксикатор через кран ввести 250 см³ CO₂), инкубировать при 37° С в термостате. Через 24 ч (в зависимости от задачи можно через 48 или 72 ч) планшет извлечь из термостата, из каждой лунки отобрать пипеткой по 400 мкл клеточной взвеси, перенести в пробирки Эппендорф и добавить в каждую такой же объем 2% параформальдегида в фосфатном буферном растворе. Инкубировать в течение 30 мин при +4° С.

Приготовление препаратов для флуоресцентной микроскопии

Пробирки с фиксированной клеточной взвесью центрифугировать при 4000 об./мин в течение 5 мин. Супернатант удалить пипеткой. Осадок суспендировать в 200 мкл фосфатного буферного раствора, содержащего 0,1% Тритон X-100 и 30 мкг/мл акридинового оранжевого. Инкубировать в течение 30 мин при +4° С. Цен-

трифугировать в течение 5 мин при 4000 об./мин. Супернатант отобрать пипеткой. Осадок ресуспендировать в 30–50 мкл фосфатного буферного раствора. Центрифугировать в течение 5 мин при 4000 об./мин. Нанести на обезжиренное предметное стекло 7–9 мкл окрашенной клеточной взвеси и накрыть покровным стеклом.

Учет результатов при микроскопии

Препараты анализировать с помощью микроскопа «Люам И2» при увеличении $\times 100$ (окуляр $10\times$). Клеточные ядра окрашены в зеленый цвет. Хроматин живой клетки имеет рыхлую неоднородную структуру. Окраска не очень яркая. Конденсированный хроматин выглядит в виде ярких, плотных, однородно окрашенных сфер или полумесяцев. Фрагментированный хроматин представлен однородно окрашенными горошинами, расположенными по стенке ядра. Оценить 500 клеток (5×100) и рассчитать среднее процентное содержание апоптотических клеток.

Трактовка результатов

Спонтанный апоптоз в лимфоцитах больных оценивается следующим образом:

- низкий — при наличии $<7\%$ апоптотических клеток;
- умеренный — при наличии 7–14% апоптотических клеток;
- высокий — при наличии 14,1–21% апоптотических клеток.
- очень высокий — при количестве апоптотических клеток $>21\%$.

При приросте количества апоптотических клеток в присутствии препаратов или после облучения:

- менее чем на 7% — клетки оцениваются как низкочувствительные к индуцированному апоптозу и, следовательно, являются низкочувствительными к данному виду воздействия;
- на 7–14% — клетки оцениваются как умеренно чувствительные к исследуемому препарату;
- на 14,1–21% — клетки являются высокочувствительными к данному препарату;
- более чем на 21% — клетки являются очень высокочувствительными к данному препарату.

Возможные трудности при выполнении метода

При некротической гибели клеток в некоторых случаях тоже происходит конденсация хроматина. Но в этом случае глыбки конденсирующегося хроматина имеют неправильные края, трудно идентифицируются и никогда не формируют ограниченные мембраной фрагменты; цитоплазма и ее органеллы прогрессивно разрушаются, повреждаются большие массивы клеток. Недостатком этого метода являются большие затраты времени при выполнении морфологической составляющей анализа, однако анализ может быть прерван на стадии фиксации клеток параформальдегидом и возобновлен в последующем.

Анализ описанных выше специфических морфологических признаков апоптоза с помощью флуоресцентной микроскопии является наиболее простым и надежным методом количественного учета клеток, элиминирующихся по пути запрограммированной клеточной гибели. Результаты, полученные с помощью этого метода, хорошо коррелируют с другими методами учета апоптотических клеток, тем более, что флуоресцентная микроскопия может использоваться для верификации других методик учета апоптотических клеток.

Противопоказания к применению: отсутствуют

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК

Использование метилтиазолтетразолия (МТТ-анализ) для выявления жизнеспособных клеток по сохранению их метаболической активности после различных экспериментальных воздействий хорошо дополняет или при определенных обстоятельствах заменяет исследование апоптотических процессов в клетках, благодаря тому, что митохондриальные дегидрогеназы живых клеток превращают растворимый 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолиум бромид в нерастворимый формазан, который переводится в растворимую форму с помощью додецилсульфата натрия или некоторых других соединений, придавая раствору пурпурный цвет, интенсивность которого зависит от числа жизнеспособных клеток и оценивается с помощью ELISA-ридера.

Показания к применению

1. Определение чувствительности лимфоцитов к химио- и лучевой терапии.
2. Выбор наиболее адекватного для терапии цитостатического препарата или их сочетания.
3. Контроль эффективности терапии.

Перечень необходимого оборудования, материалов, реактивов, лекарственных средств

Перечень необходимого оборудования

1. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки — ГОСТ 1770–74 (ИСО 1042–83, ИСО 4788–80).
2. Пипетки стеклянные мерные на 1, 2, 5, 10 мл — ГОСТ 20292–74.
3. Автоматические дозаторы на 40, 200, 1000 мкл.
4. Наконечники для автоматических дозаторов (Sarstedt, США).
5. 96-луночные пластиковые планшеты для культивирования тканей (Sarstedt, Германия или Costar, Великобритания).
6. Установка обеспыливания (ламинар для клеточных культур) УО-БГ, допускается бокс с ламинарным током воздуха.
7. Центрифуга ОПн–5.
8. Термостат ТС-80, с температурой $(37 \pm 1)^\circ \text{C}$, допускается инкубатор с подачей CO_2 .
9. Источник CO_2 .
10. Источник для облучения клеток (при необходимости — установка для лучевой терапии).
11. Центрифуга ОПн-3У 4.2.
12. Набор ареометров общего пользования (Минприбор, СССР, допускается другой).
13. Холодильник для хранения ростовой среды и других растворов при температуре $(4 \pm 2)^\circ \text{C}$.
14. Морозильник для хранения эмбриональной телячьей сыворотки и других растворов при температуре $(-18 \pm 2)^\circ \text{C}$.
15. Сушильно-стерилизационный шкаф ССШ-80.
16. ELISA-ридер (Sanofi Pastuer PR-2100, Франция) с фильтром 540 нмоль.
17. Эксикатор стеклянный с краном, диаметр 190 мм.

18. Микроскоп световой ($\times 200-400$) для подсчета клеток в камере Горяева.

19. Камера Горяева.

20. Счетчик Адамса для подсчета клеток.

21. Пробки резиновые ПР 27, 24, 20, 19, 18, 16, 14,5 — ГОСТ 7852–76.

Перечень реактивов

1. Фиколл-400 (Pharmacia, Швеция).

2. Верографин 76 или 60% (Spofa, Чехия).

3. Гепарин, стерильный раствор для инъекций, в 1 мл 5000 ЕД (АО «Белмедпрепараты»).

4. Хлорид натрия, изотонический раствор 0,9% для инъекций.

5. Среда Ицков, модифицированная Дюльбекко, с L-глутамином (Sigma, США).

6. Эмбриональная телячья сыворотка (Sigma, США), допускается использование сыворотки крови эмбриональной (КРС, Минздрав РБ, ГУ НИИЭМ).

7. Пенициллин.

8. Стрептомицин.

9. Фосфатный буферный раствор Дюльбекко (Sigma, США).

10. Лекарственные препараты.

11. Бикарбонат натрия — ГОСТ 4201–79.

12. МТТ (3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенил тетразолиум бромид) (Sigma, США).

13. Додецилсульфат натрия (Serva, Германия).

14. Изопропанол (Aldrich, США).

15. Ледяная уксусная кислота — ГОСТ 61–75 (СТ СЭВ 5375–85).

16. Соляная кислота.

17. Ацетат натрия.

18. Трипановый синий.

19. Азид натрия.

Технология использования метода

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 бидистиллированной 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. Раствор для стабилизации крови: 125 мкл раствора гепарина 5000 ЕД/мл + 2,375 мл раствора среды Дюльбекко.

5. Основной раствор антибиотиков: пенициллин 100 000 ЕД/мл + стрептомицин 100 мг/мл.

6. Растворы лекарственных препаратов в концентрациях, соответствующих терапевтическим.

7. Полная питательная среда (среда IMDM): 17,7 г IMDM + 3,02 г бикарбоната натрия + 1000 мл дистиллированной воды.

8. Фосфатный буферный раствор Дюльбекко: 9,6 г буфера + 1000 мл дистиллированной воды.

9. Раствор МТТ (3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенил тетразолиум бромид) в концентрации 5 мг/мл в фосфатном буферном растворе.

10. Раствор солиобелизатора: 10% додецилсульфата натрия, 50% изопропанола, 10 ммоль HCl (1/1000, т.е. 1 мл концентрированной (10 моль) HCl на 1 л раствора), pH довести до 5,5 одномолярным ацетатным буфером.

11. Ацетатный буфер: раствор 1 (0,5 моль раствор уксусной кислоты: 29 мл ледяной уксусной кислоты + дистиллированная вода до 1000 мл); раствор 2 (0,5 моль раствор ацетата натрия однозамещенного Na (CH₂COO): 68 г CH₂COONa + дистиллированная вода до 1000 мл)); смешать 10 мл раствора 1 и 90 мл раствора 2.

12. Раствор трипанового синего: 0,5% в фосфатном буферном растворе с добавлением NaN₃ 0,02% (3 ммоль), т.е. 50 мг трипанового синего + 100 мкл азида натрия 2% + фосфатный буферный раствор до 10 мкл.

Выделение клеток

В стерильные флаконы для взятия крови внести 1 мл раствора гепарина в среде и 9 мл венозной крови, перемешать. Кровь раз-

вести физиологическим раствором в соотношении 2:1. Разведенную кровь медленно наложить в пробирке на фиколл-верографин (2 мл фиколл-верографина и 8 мл крови). Центрифугировать в течение 30 мин при 1500 об./мин. Лимфоциты образуют белое кольцо на поверхности фиколл-верографина. Пипеткой с тонким концом собрать кольцо лимфоцитов и перенести в отдельную пробирку. Отмыть лимфоциты путем добавления физиологического раствора и центрифугирования при 1200 об./мин в течение 15 мин. Супернатант удалить, осадок ресуспендировать при добавлении физиологического раствора. Центрифугировать в течение 10 мин при 1200 об./мин. Осадок использовать как источник клеток.

Культивирование клеток

Полученную клеточную взвесь (в концентрации 1,5–2 млн клеток в 1 мл среды) внести в среду для культивирования (раствор среды Дюльбекко, 10% эмбриональная сыворотка, 0,1% основного раствора антибиотиков (пенициллин + стрептомицин) (далее — полная среда). Взвесь внести по 90 мкл на лунку в 96-луночную планшету; в те же лунки добавить исследуемые препараты в заданных концентрациях и объемах 5–20 мкл. Для каждого препарата или его разведений использовать по три лунки (дублирующие друг друга триплеты необходимы для получения среднего значения и ошибки среднего). Для контроля в первые три лунки горизонтальной дорожки планшеты внести только взвесь клеток. В первую вертикальную дорожку планшеты внести только ростовую среду (нулевое значение оптической плотности при считывании результатов). Планшету поместить в эксикатор с увлажненной атмосферой и 5% CO₂ (в эксикатор через кран ввести 250 см³ CO₂), инкубировать 48 ч при 37° С в термостате.

Постановка МТТ-теста

Извлечь эксикатор из термостата и перенесите в ламинарный бокс. В каждую анализируемую лунку (в том числе в лунки, которые содержат только ростовую среду) добавить по 100 мкл солибилизирующей смеси, содержащей 50% пропанола-2, 10% додецилсульфата натрия, 0,01 N соляной кислоты. Для полноты растворения содержимое лунок энергично пипетировать (20–30 толчков на лун-

ку). Закрытый планшет перенести в холодильник и выдержать в течение 20–25 мин до осаждения пены в лунках.

Учет результатов

Открыть планшет и перенести его в прибор ELISA-ридер, 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.

Перевести полученные результаты в проценты, используя формулу:

$$\text{ФЖК} = \frac{\text{ОП исслед. образца}}{\text{ОП контроля}} \times 100\%,$$

где ФЖК — фракция жизнеспособных клеток;

ОП исслед. образца — оптическая плотность исследуемого образца;

ОП контроля — оптическая плотность контроля.

Рассчитать среднее значение и ошибку среднего для каждого анализируемого цитотоксического соединения, используя соответствующие стандартные статистические формулы или компьютерные статистические программы. Построить график зависимости жизнеспособности клеток (в процентах) от концентрации исследуемого цитотоксического вещества, если исследовали различные концентрации препаратов, и определить концентрацию, вызывающую гибель 50% клеток (LC50).

Трактовка результатов

1. Клетки больных считали резистентными к исследуемому препарату при величине фракции выживших клеток $>90\%$.

2. На низкую чувствительность клеток к препаратам указывала величина фракции живых клеток в пределах от 60 до 90%.

3. При умеренной чувствительности клеток к исследуемым воздействиям ФЖК составляла 59–40%.

4. О высокой чувствительности клеток к препаратам свидетельствовала величина ФЖК в пределах 39–15%.

5. Очень высокую чувствительность клеток к препаратам регистрировали в том случае, если после воздействия препаратов оставалось не более 14% жизнеспособных клеток.

Возможные трудности при выполнении метода

Бактериальная контаминация исследуемого образца (в лунках визуально определяется помутнение среды, хлопья). При среднем значении ФЖК в контрольных лунках менее 50% результаты МТТ-теста могут быть не достоверны.

Противопоказания к применению: отсутствуют.