МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель Министра
здравоохранения
Республики Беларусь

_____Б.Н. Андросюк
«____»_____20___ г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ЛЕЙКОЗНЫХ КЛЕТОК К ХИМИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИМ ЛЕКАРСТВЕННЫМ СРЕДСТВАМ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИХ РЕДОКС-СОСТОЯНИЯ «ОВБ-ЛЕК-ОТВЕТ»

СОГЛАСОВАНО
Заместитель директора
РУП «Центр экспертиз
и испытаний в здравоохранении»

_____М.И. Злотникова
«____»_____20___ г.

СОГЛАСОВАНО
Директор ГУ «Республиканский
научно-практический центр
трансфузиологии и медицинских
биотехнологий»

_____Ф.Н. Карпенко
«08»_____10_____2020 г.

СОГЛАСОВАНО
Главный врач
УЗ «Минская ордена Трудового Красного
знамени областная клиническая больница»

_____А.А. Линкевич
«__»_____2022 г.

СОГЛАСОВАНО
Директор ГУ «Республиканский
научно-практический центр радиационной
медицины и экологии человека»

_____А.В. Рожко
«05»_____09_____2022 г.

СОГЛАСОВАНО
Директор ГУ «Республиканский научно-
практический центр детской онкологии,
гематологии и иммунологии»

_____А.В. Солнцева
«01»_____08_____2022 г.

2020

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

1 НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

1.1 Набор реагентов для определения чувствительности лейкозных клеток к химиотерапевтическим лекарственным средствам в зависимости от их редокс-состояния «ОВБ-ЛЕК-ОТВЕТ» (далее – набор реагентов, сокращенное наименование – ОВБ-ЛЕК-ОТВЕТ), предназначенный для количественного определения содержания низкомолекулярных антиоксидантов в периферических мононуклеарных клетках крови, при действии на них лекарственных препаратов, спектрофотометрическим методом с использованием модельной системы «метмиоглобин-H_2O_2-АБТС-ТРОЛОКС» (далее – ТЭАА-тест).

Используется свежеполученный образец мононуклеарных клеток периферической крови от пациентов с хроническим лимфоцитарным или острым лимфобластными лейкозом (далее образец клеток). Допускается также использование образцов мононуклеарных клеток костного мозга, пунктатов лимфатических узлов, спинномозговой жидкости или плевральной жидкости пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями. Исходная жизнеспособность выделенных клеток должна быть не менее 85 %.

1.2 Количественное определение общего содержания низкомолекулярных антиоксидантов в лимфоидных клетках необходимо для оценки активности панели лекарственных средств (степени их метаболизма в клетках) и диагностики индивидуальной лекарственной чувствительности при лимфопролиферативных заболеваниях, что является более адекватным основанием для принятия решения о выборе тактики терапии в конкретных условиях.

Данный набор реагентов может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на лечение пациентов с хроническим лимфоцитарным лейкозом или острым лимфобластным лейкозом до 60 лет с использованием традиционных курсов химиотерапии, и предназначен для врачей-гематологов, врачей-лаборантов, а также для врачей-специалистов и исследователей в области онкогематологии.

1.3 Показания к применению набора реагентов: диагноз у пациента – хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ, по классификации Binet или Rai) или острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ (Т- и В-варианты) по EGIL-классификации).

1.4 Противопоказаний для применения набора реагентов нет.

2 ХАРАКТЕРИСТИКИ И ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

2.1 Состав набора реагентов

В комплект поставки набора реагентов входят инструкция по применению и следующие компоненты набора реагентов:

– 96-луночный планшет с лиофилизированными лекарственными препаратами, стерильный – 1 шт.;

– 96-луночный планшет для оценки редокс-статуса клеток, стерильный – 1 шт.;

– полная среда для культивирования клеток, стерильная (7 мл) – 1 флакон;

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

– ненасыщенная среда для культивирования клеток, стерильная (1,5 мл) – 1 микропробирка;

– буферный раствор (10х) для исследования (0,8 мл) – 1 микропробирка;

– фосфатно-цитратный буфер, порошок (154 мг) – 1 микропробирка;

– фосфатно-солевой буфер, порошок (1 г) – 1 микропробирка;

– миоглобин из сердца лошади, порошок (1 мг) – 1 микропробирка;

– 6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновая кислота (ТРОЛОКС – водорастворимый аналог α-токоферола), порошок (0,6 мг) – 1 микропробирка;

– 2,2-азино-бис (3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты) диаммониевая соль (АБТС), порошок (1,2 мг) – 1 микропробирка;

– пероксид водорода 3 % (0,03 мл) – 1 микропробирка.

2.2 Набор реагентов ОВБ-ЛЕК-ОТВЕТ рассчитан на проведение анализа спектра индивидуальной химиочувствительности одного образца клеток (до 12 лекарственных средств). Для каждого образца клеток регистрируется оптическая плотность 6-ти контрольных лунок с интактными клетками в полной среде для культивирования клеток, 6-ти контрольных лунок с интактными клетками и плазмой пациента в ненасыщенной среде для культивирования клеток (при тестировании ритуксимаба), оптическая плотность лунок с лекарственными средствами в триплетах (36 лунок), оптическая плотность лунок с различными концентрациями ТРОЛОКСА для построения калибровочной кривой (18 лунок). Таким образом, проводится 66 определений оптической плотности.

2.3 Принцип работы набора реагентов

Метод определения лекарственной чувствительности лимфоидных клеток человека в зависимости от их окислительно-восстановительного баланса основан на количественном определении содержания низкомолекулярных антиоксидантов (восстановителей), как основного звена окислительно-восстановительного баланса клеток, смещение которого в сторону окислителей сопровождается запуском процессов программируемой клеточной гибели (апоптоза).

Принцип количественного определения низкомолекулярных антиоксидантов с использованием модельной системы «метмиоглобин-H_2O_2-АБТС-ТРОЛОКС» заключается в формировании феррил-миоглобин радикала из метмиоглобина и пероксида водорода, который окисляет АБТС (2,2-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты) диаммониевую соль), с образованием радикала АБТС$^{\bullet+}$ – растворимого хромогена, при этом раствор окрашивается в зеленый цвет, оптическая плотность которого определяется с помощью спектрофотометра при длине волны 405 нм. Антиоксиданты подавляют продукцию радикала АБТС$^{\bullet+}$ концентрационно-зависимым образом и интенсивность окраски снижается пропорционально их содержанию, что выражается в снижении оптической плотности образца.

3 ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ

Персонал, использующий набор реагентов, должен быть обеспечен в установленном порядке средствами индивидуальной защиты и спецодеждой, должен соблюдать правила личной гигиены и асептики, принятые в медицинских учреждениях в отношении препаратов крови, в соответствии с действующим законодательством Республики Беларусь.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Меры предосторожности при выполнении работ с условно-патогенным биологическим материалом должны выполняться в соответствии с требованиями санитарных норм и правил «Требования к организации и проведению санитарно-противоэпидемических мероприятий, направленных на предупреждение возникновения и распространения вирусных гепатитов», утвержденные постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 6 февраля 2013 г. № 11.

Персонал, использующий набор реагентов, должен соблюдать правила работы с химическими веществами. При попадании на кожу или в глаза любых компонентов набора реагентов их необходимо смыть большим количеством воды.

Утилизация брака и отходов от набора реагентов после его использования проводится в соответствии с требованиями санитарных норм и правил «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами», утвержденные постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 7 февраля 2018 г. № 14.

4 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

– микропланшетный спектрофотометр, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках планшета при длине волны 405 нм;

– ламинарный бокс 2-го класса безопасности;

– CO_2 инкубатор с увлажнителем газа;

– холодильник, поддерживающий температуру от +2 °С до +6 °С;

– центрифуга с охлаждением до температуры +4 °С и ротором для микропробирок типа «эппендорф»;

– микропробирки типа «эппендорф» остроконечные (1,5-2 мл);

– шейкер для микропробирок типа «эппендорф»;

– ультразвуковая ванна или морозильник, поддерживающий температуру до –70 °С (допускается применение жидкого азота);

– одноканальные дозаторы переменного объема 2-20, 20-200 и 200-1000 мкл;

– стерильные одноразовые наконечники для дозаторов;

– иономер универсальный или любой другой pH-метр с пределом допускаемой основной погрешности ± 0,05 pH;

– световой микроскоп с камерой для подсчета клеток (камера Горяева) или проточный цитофлуориметр;

– штативы для пробирок и микропробирок;

– перчатки хирургические.

Примечание: к набору реагентов не прилагаются реактивы для выделения периферической мононуклеарной фракции клеток из биологических сред организма.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

5 ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ И ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

5.1 За 1 ч до проведения анализа компоненты набора реагентов ОВБ-ЛЕК-ОТВЕТ должны быть перенесены из холодильника в помещение с комнатной температурой.

ВНИМАНИЕ! Все манипуляции, описанные в пунктах 5.2-5.9, проводятся в ламинарном боксе в стерильных условиях!

5.2 Вскрыть упаковку планшета с лиофилизированными лекарственными препаратами. После вскрытия упаковки планшет с химиопрепаратами допускается хранить при температуре +4 °С в течение месяца, но запрещается использовать в экспериментах с долгосрочной инкубацией образцов (свыше 6 ч).

5.3 Помечать в протоколе и/или на крышке планшета внесение в лунки планшета следующих компонентов:

- ✓ интактных клеток в полной среде для культивирования клеток (контроль для химиопрепаратов),
- ✓ интактных клеток с плазмой пациента в ненасыщенной среде для культивирования клеток (контроль при тестировании ритуксимаба),
- ✓ образца клеток в среде для культивирования в лунки с тестируемыми препаратами.

После вскрытия ненасыщенную и полную среду для культивирования клеток допускается хранить при температуре +4 °С не более двух недель, но запрещается использовать в экспериментах с долгосрочной инкубацией образцов (свыше 6 ч).

5.4 Часть образца клеток, полученных после выделения из крови пациента, развести содержимым флакона с полной средой для культивирования клеток до концентрации 2×10^6/мл (финальный объем суспензии 4,5 мл). Для исследования чувствительности клеток пациента к каждому лекарственному средству необходимо добавить по 300 мкл клеточной суспензии указанной концентрации (в каждую лунку триплета по 100 мкл), а также по 600 мкл клеточной суспензии в этой же концентрации для раскапывания в 6 лунок контроля (2 триплета) для химиопрепаратов (в соответствии с нижеприведенной схемой).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C		K	FLB	FLB	FLB	DEX	DEX	DEX	CHL	CHL	CHL	
D		K	CPH	CPH	CPH	MTX	MTX	MTX	6-MP	6-MP	6-MP	
E		K	PRD	PRD	PRD	IMB	IMB	IMB	ASP	ASP	ASP	
F		Kr	VINC	VINC	VINC	AraC	AraC	AraC	RIT	RIT	RIT	
G		Kr	Kr		K	K	K		Kr	Kr	Kr	
H												

K – контроль для химиопрепаратов
Kr – контроль для ритуксимаб
FLB – флударабел
CPH – циклофосфамид
PRD – преднизолон
VINC – винкристин
DEX – дексаметазон
MTX – метотрексат
IMB – иматиниб
AraC – цитарабин
CHL – хлорамбуцил
6-MP – меркаптопурин
ASP – аспарагиназа
RIT – ритуксимаб

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

5.5 Внести по 100 мкл суспензии образца клеток (полученной в пункте 5.4) в полной среде для культивирования клеток в лунки C2-E2 и G5-G7 (контроль для химиопрепаратов) планшета, а также в лунки с теми лекарственными средствами, к которым будет оцениваться чувствительность образца клеток (в соответствии с вышеприведенной схемой). Для полноты растворения лекарственных средств содержимое лунок энергично пипетировать (5-10 толчков на лунку без образования пузырьков воздуха в суспензии), меняя наконечники после каждого триплета с препаратом.

5.6 При необходимости исследования чувствительности клеток к лекарственному средству ритуксимаб добавить в отдельную пробирку 52 мкл плазмы крови пациента с лимфопролиферативным заболеванием. Часть образца клеток, полученных после выделения из крови пациента, развести в этой пробирке до конечного объема 1,04 мл содержимым флакона с ненасыщенной средой для культивирования клеток (конечная концентрация клеток 2×10^6/мл).

5.7 Внести по 100 мкл суспензии образца клеток (полученной в пункте 5.6) с плазмой крови пациента в ненасыщенной среде для культивирования клеток в лунки F2, G2, G3, G9-G11 планшета (контроль для ритуксимаб), а также в лунки F9-F11 (риткусимаб). Для полноты растворения лекарственных средств содержимое лунок энергично пипетировать (5-10 толчков на лунку без образования пузырьков воздуха в суспензии).

5.8 Планшет поместить в CO_2 инкубатор и инкубировать в течение 24 ч в увлажненной атмосфере (относительная влажность воздуха от 90 % до 95 %) с 5 % содержанием CO_2 при температуре +37 °С.

5.9 За сутки до проведения ТЭАА-теста приготовить необходимые растворы и компоненты:

а) Приготовление раствора фосфатно-цитратного буфера (pH 5,0). В пластиковую пробирку объемом не менее 15 мл налить 12 мл деионизованной ультрачистой воды (удельное сопротивление воды при температуре +25 °С должно быть не ниже 18,18 МОм·см) и растворить в ней 154 мг солей, необходимых для приготовления фосфатно-цитратного буфера. Размешать до полного растворения и через 1 ч проверить pH раствора (pH должно быть в диапазоне от 4,9 до 5,1).

Приготовленный раствор фосфатно-цитратного буфера допускается хранить при температуре +4 °С в течение двух недель.

б) Приготовление раствора субстрата из АБТС. К 1,2 мг АБТС добавить 1,2 мл раствора фосфатно-цитратного буфера (pH 5,0) и тщательно перемешать на шейкере для микропробирок. Полученный раствор перелить в пробирку с остатком раствора фосфатно-цитратного буфера и перемешивать до полного растворения АБТС.

Приготовленный раствор субстрата из АБТС допускается хранить при температуре +4 °С не более двух недель или при температуре –20 °С в течение месяца.

в) Приготовление буферного раствора для исследования (1х). К 7,2 мл деионизованной ультрачистой воды (удельное сопротивление воды при температуре +25 °С должно быть не ниже 18,18 МОм·см) добавить 0,8 мл буферного раствора для исследования (10х) и тщательно перемешать на шейкере.

Приготовленный буферный раствор для исследования допускается хранить при температуре +4 °С в течение двух недель.

г) Приготовление стокового раствора миоглобина. К 1 мг миоглобина из сердца лошади добавить 285 мкл деионизованной ультрачистой воды (удельное сопротивление воды при температуре +25 °С должно быть не ниже 18,18 МОм·см) и тщательно перемешать на вортексе, а затем поставить на шейкер и перемешивать в течение 20-30 мин.

Стоковый раствор миоглобина допускается хранить при температуре –20 °С в течение 6 месяцев. Размораживать непосредственно перед проведением измерения.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

д) Приготовление рабочего раствора ТРОЛОКС (1,5 мМ). К 0,6 мг ТРОЛОКСА добавить 1,6 мл буферного раствора для исследования (1х) и перемешать до его полного растворения. Полученный раствор ТРОЛОКСА используется для построения калибровочной кривой.

Приготовленный рабочий раствор ТРОЛОКСА в микропробирках типа «эппендорф» по 300 мкл допускается хранить при температуре –20 °С в течение 3-х месяцев. Размораживать и титровать непосредственно перед проведением измерения.

е) Приготовление 10мМ фосфатно-солевого буфера (PBS, pH 7,4). В стеклянную емкость объемом не менее 120 мл налить 100 мл деионизованной ультрачистой воды (удельное сопротивление воды при температуре +25 °С должно быть не ниже 18,18 МОм·см) и растворить в ней таблетку, содержащую 1 г солей, необходимых для приготовления 10 мМ PBS. Размешать до полного растворения и через 1 ч проверить pH раствора (pH должно быть в диапазоне от 7,3 до 7,5).

Приготовленный раствор фосфатно-солевого буфера допускается хранить при температуре +4 °С в течение месяца.

5.10 По истечении времени инкубации достать из холодильника все растворы, необходимые для постановки ТЭАА-теста. Из инкубатора достать планшет и последовательно, пипетируя каждую лунку (5-10 толчков на лунку без образования пузырьков воздуха в суспензии), перенести содержимое планшета в заранее подготовленные остроконечные микропробирки типа «эппендорф» (всего 16 микропробирок при использовании всей панели химиопрепаратов, каждый триплет необходимо поместить в отдельную микропробирку).

5.11 Добавить в каждую микропробирку по 1,0 мл PBS для отмывки клеток от культуральной среды и химиопрепаратов. Хорошо перемешать на шейкере (до образования вихревого потока). Поместить пробирки в центрифугу и осадить клетки в течение 7-10 мин (300g, температура +4 °С). Вынуть пробирки из центрифуги, визуально проверить наличие пятнышка клеток на дне микропробирок. Аккуратно отобрать дозатором супернатант из микропробирок, не оставляя в них жидкости и не затрагивая пятнышко клеток.

5.12 В каждую микропробирку добавить по 1,3 мл PBS и повторить п.5.11.

5.13 Добавить к осажденным клеткам по 30 мкл холодного буферного раствора для исследования (1х) при температуре +4 °С. Встряхнуть на шейкере и поместить на 20 мин в морозильник при температуре –70 °С или в жидкий азот при температуре –196 °С на 2 мин. Затем достать и оставить при комнатной температуре до полного оттаивания. Данную процедуру повторить трижды.

Для лизиса клеток также допускается использование ультразвуковой ванны. Для чего клетки необходимо поместить в емкость со льдом и проводить обработку ультразвуком в течение 1-2 мин (в зависимости от частоты и мощности сигнала). После этого провести их охлаждение в течение 1-2 мин, опустив пробирки в емкость со льдом. Данную процедуру повторить трижды.

5.14 Полученный клеточный лизат встряхнуть на шейкере и поместить в центрифугу на 15 мин (12000g, температура +4 °С) для осаждения неразрушенных фрагментов и мембранных структур.

5.15 Приготовить рабочий раствор миоглобина: к 15 мкл стокового раствора миоглобина необходимо добавить 1485 мкл буферного раствора для исследования (1х). Тщательно перемешать на шейкере в течение 2-3 мин.

5.16 Приготовить ТРОЛОКС стандарты в 6 микропробирках для построения калибровочной кривой, согласно нижеприведенной таблице 1.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 1 – Схема приготовления ТРОЛОКС стандартов.

Микро-пробирка	Рабочий раствор ТРОЛОКС (1,5 мМ), мкл	Буферный раствор для исследования (1х), мкл	Концентрация ТРОЛОКС стандартов, мМ
1	0	500	0
2	5	495	0,015
3	15	485	0,045
4	35	465	0,105
5	70	430	0,21
6	140	360	0,42

5.17 Вскрыть упаковку планшета для оценки редокс-статуса клеток (После вскрытия упаковки планшет можно хранить при комнатной температуре, но запрещается использовать в экспериментах с долгосрочной инкубацией образцов (свыше 6 ч)). Согласно нижеприведенной схеме поместить во все экспериментальные лунки (66 лунок) по 20 мкл рабочего раствора миоглобина. После этого поместить в лунки A6, D6 и G6 по 10 мкл приготовленного ТРОЛОКС стандарта (п. 5.16) из микропробирки № 6, в лунки A5, D5 и G5 – по 10 мкл ТРОЛОКС стандарта из микропробирки № 5. Остальные ТРОЛОКС стандарты (пробирки № 1-4) помещают в соответствующие лунки (A1-A4, D1-D4, G1-G4).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TROL	TROL	TROL	TROL	TROL	TROL						
B	K	K	K	FLB	FLB	FLB	DEX	DEX	DEX	CHL	CHL	CHL
C	CPH	CPH	CPH	MTX	MTX	MTX	6-MP	6-MP	6-MP	PRD	PRD	PRD
D	TROL	TROL	TROL	TROL	TROL	TROL						
E	IMB	IMB	IMB	ASP	ASP	ASP	VINC	VINC	VINC	AraC	AraC	AraC
F	Kr	Kr	Kr	RIT	RIT	RIT	Kr	Kr	Kr	K	K	K
G	TROL	TROL	TROL	TROL	TROL	TROL						
H												

K – контроль для химиопрепаратов
Kr – контроль для ритуксимаб
FLB – флударабел
CPH – циклофосфамид
PRD – преднизолон
VINC – винкристин
DEX – дексаметазон
MTX – метотрексат
IMB – иматиниб
AraC – цитарабин
CHL – хлорамбуцил
6-MP – меркаптопурин
ASP – аспарагиназа
RIT – ритуксимаб
TROL – ТРОЛОКС стандарт

5.18 Аккуратно (не затрагивая осадок) отобрать с осажденного клеточного лизата в каждой микропробирке (п. 5.14) по 10 мкл супернатанта (три раза) и поместить в соответствующие лунки триплета планшета для оценки редокс-статуса клеток в соответствии с вышеприведенной схемой (п. 5.17, лунки B1-B12, C1-C12, E1-E12, F1-F12).

5.19 Приготовить рабочий раствор субстрата АБТС. К 12 мл раствора субстрата из АБТС (п. 5.9 б) добавить 30 мкл пероксида водорода (3 %) и тщательно перемешать в течение 2-3 мин. Включить планшетный спектрофотометр и настроить программное обеспечение для измерения оптической плотности (12 повторов, время накопления 0,3 с) при длине волны $\lambda = 405$ нм.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

5.20 Добавить во все экспериментальные лунки планшета для оценки редокс-статуса клеток (66 лунок) по 150 мкл рабочего раствора субстрата АБТС (п. 5.19). Следить за тем, чтобы время раскапывания планшета для оценки редокс-статуса клеток не превышало 2-3 мин. Планшет слегка встряхнуть, установить в рабочую камеру спектрофотометра и незамедлительно провести измерения оптической плотности при $\lambda = 405$ нм.

Примечание: Количество повторных измерений (n = 12) указано для температуры окружающего воздуха (22 ± 3 °С). При выходе температуры окружающего воздуха за указанные рамки допускается снизить или увеличить количество повторных измерений.

5.21 Для возможности пересчета значений оптической плотности в количественные показатели содержания низкомолекулярных антиоксидантов в ПМНК необходимо построить калибровочную кривую (рисунок 1), используя соответствующие статистические компьютерные программы (Microsoft Excel, Statistica, OriginPro и т.п.), по средним значениям оптической плотности, полученным в лунках A1-A6, D1-D6, G1-G6.

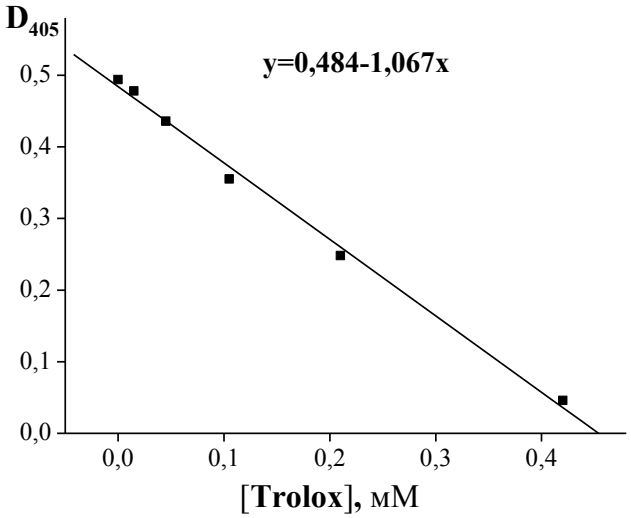


Рисунок 1 – Калибровочная кривая для количественного определения содержания низкомолекулярных антиоксидантов.

Концентрацию низкомолекулярных антиоксидантов [НА] в мононуклеарных клетках крови человека определяют согласно уравнению, полученному из линейной регрессии калибровочной кривой:

$$[HA] = \frac{D_{405} - A}{tg\alpha} \times N$$

где [НА] – концентрация низкомолекулярных антиоксидантов, мМ;
D_{405} – среднее значение оптической плотности образца при 405 нм;
А – отрезок, отсекаемый на оси Y калибровочной кривой;
tgα – тангенс угла наклона калибровочной кривой;
N – фактор разведения клеток.

Примечание: Значения оптической плотности лунок A1-A6, D1-D6, G1-G6 для построения калибровочной кривой необходимо использовать из варианта измерения, предшествующего тому, в котором в лунках A6, D6 и G6 начинают увеличиваться значения.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

5.22 Рассчитать среднее арифметическое значение и ошибку среднего для каждого анализируемого цитотоксического соединения, используя соответствующие стандартные статистические формулы или соответствующие статистические компьютерные программы (Microsoft Excel, Statistica, OriginPro и т.п.).

Примечание: Из-за разного содержания антиоксидантов в реальных образцах и ТРОЛОКС стандартах скорость окисления в системе «метмиоглобин-H_2O_2-АБТС-ТРОЛОКС» и «метмиоглобин-H_2O_2-АБТС-образец» может не совпадать. Рекомендуется использовать вариант измерения реальных образцов со значениями оптической плотности, укладывающимися на линейный участок калибровочной кривой (ограничен 10 % интервалами от начала и конца кривой).

5.23 Составить индивидуальный профиль лекарственной чувствительности клеток пациента согласно полученным значениям относительного содержания НА (ОСНА) после воздействия противоопухолевых лекарственных средств. Заполнить таблицу 2, представленную ниже, в качестве примера.

Примечание: Итоговые данные представить в виде абсолютной величины содержания НА в исследуемом образце (мМ/млн кл). При составлении индивидуального профиля лекарственной чувствительности клеток пациентов *in vitro* полученные результаты необходимо представить в виде отношения среднего значения концентрации НА в клетках после воздействия *in vitro* противоопухолевых лекарственных средств в терапевтических концентрациях ([НА]) к среднему значению концентрации антиоксидантов в интактных клетках ($[НА]_к$), выраженного в процентах.

Таблица 2 – Индивидуальный профиль лекарственной чувствительности клеток *in vitro*

Противоопухолевый лекарственный препарат	Относительное содержание НА ($\frac{[НА]}{[НА]_к}$,%)	Расположение лекарственных препаратов в порядке увеличения к ним чувствительности клеток
Флударабел	172	1
Винкристин	163	2
Дексаметазон	154	3
Иматиниб	127	4
Аспарагиназа	122	5
Метотрексат	113	6
Хлорамбуцил	102	7
Цитарабин	95	8
Меркаптопурин	88	9
Ритуксимаб	82	10
Циклофосфамид	76	11
Преднизолон	68	12

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Определить выраженность чувствительности опухолевых клеток к анализируемым лекарственным средствам по ОСНА:

– (менее 75 % ОСНА в клетках) – очень высокая;
– (75 – 99 % ОСНА в клетках) – высокая;
– (100 – 124 % ОСНА в клетках) – умеренная;
– (125 – 159 % ОСНА в клетках) – низкая;
– (160 % и более ОСНА в клетках) – резистентность.

6 ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ АНАЛИЗА И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Перечень возможных осложнений или ошибок при выполнении анализа и пути их устранения приведены в таблице 2.

Таблица 3 – Перечень возможных осложнений или ошибок при выполнении анализа и пути их устранения

Перечень возможных осложнений или ошибок при выполнении анализа	**Пути устранения**
Низкое количество клеток в исследуемом образце	Концентрирование клеток с последующим ограничением спектра исследуемых лекарственных средств
Значения оптической плотности слишком высокие и не укладываются на выбранную калибровочную кривую	1. Взято слишком малое количество клеток для анализа. 2. Осталось большое количество супернатанта после выполнения пункта 5.12. 3. Увеличено время раскапывания планшета для оценки редокс-статуса клеток (п. 5.20)
Результаты неадекватны при содержании опухолевых клеток в образце менее 70 %	Повторная постановка анализа
Непостоянство лекарственной чувствительности клеток в процессе терапии	Проведение анализа непосредственно перед решением вопроса о назначении терапии, повторные определения при необходимости смены терапии в процессе течения заболевания
Трудность учета действия лекарственных средств из-за различного их метаболизма в печени, скорости выведения лекарственных средств из организма, реакций организма на лейкозные клетки	Оценка клинических и стандартных лабораторных показателей ответа пациента на терапию

7 СРОК ГОДНОСТИ

Срок годности набора реагентов ОБВ-ЛЕК-ОТВЕТ – 1 год от даты его изготовления.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

8 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов ОВБ-ЛЕК-ОТВЕТ должен храниться в сухом, защищенном от света месте при температуре от +2 °С до +6 °С в течение всего срока годности.

Условия транспортирования набора реагентов должны соответствовать условиям его хранения.

Набор реагентов транспортируют всеми видами транспорта в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозки грузов, действующими на каждом виде транспорта.

Не смешивать компоненты набора реагентов ОВБ-ЛЕК-ОТВЕТ из разных серий.

Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора реагентов ОВБ-ЛЕК-ОТВЕТ и квалифицированное проведение анализа.

9 ЮРИДИЧЕСКИЙ АДРЕС ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий» (РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий)

220053, Республика Беларусь, г. Минск, Долгиновский тракт, 160

УНП 190572781, ОКПО 37652513

Тел. (8-017) 289-01-06; факс: (8-017) 289-87-45;

e-mail: rnpc@blood.by; http://blood.by/

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru