

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

_____ Д.Л. Пиневиц

«_____» _____ 2019 г.

Регистрационный № _____

**Методы определения аллореактивности и гаплотипа КШ -
рецепторов естественных киллерных клеток донора**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»

АВТОРЫ:

к.б.н. Шман Т.В., Вашкевич Е.П., Матвеевко М.А., Мигас А.А.,
Марейко Ю.Е., к.м.н. Минаковская Н.В., д.м.н., профессор, член-корр.
НАН Беларуси Алейникова О.В.

Минск, 2019

В настоящей инструкции по применению (далее-инструкция) изложены методы определения аллореактивности и гаплотипа К1К-рецепторов естественных киллерных (ЕК) клеток донора при проведении аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) для пациентов со злокачественными новообразованиями и болезнями крови.

Выбор оптимального донора для аллогенной ТГСК с учетом данных об особенностях К1К-рецепторов позволяет уменьшить частоту развития острой реакции трансплантат против хозяина у пациентов с болезнями крови и кроветворных органов, а также снизить количество рецидивов после ТГСК у пациентов со злокачественными новообразованиями.

Инструкция может быть использована в комплексе медицинских услуг, направленных на лечение пациентов с болезнями крови (Б50-Б89) и злокачественными новообразованиями лимфоидной, кроветворной и родственных им тканей (С81-С96), нуждающихся в аллогенной ТГСК. Метод изложенный в настоящей инструкции предназначен для врачей - специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам со злокачественными новообразованиями в стационарных и/или амбулаторных условиях.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Болезни крови и злокачественные новообразования лимфоидной, кроветворной и родственных им тканей, нуждающихся в аллогенной ТГСК

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Нет

СПИСОК СОКРАЩЕНИИ

ТГСК - трансплантация гемопоэтических стволовых клеток,

ЕК - естественные киллеры,

РТПХ - реакция трансплантат против хозяина,

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота,

МНК - моноклеарные клетки,

ПЦР - полимеразная цепная реакция,

ФСБ - фосфатно-солевой буфер,

ЫЛ - питай лейкоcyле апИдеп,

К1К - кШег 1д-Нке гесергог.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИИ, РЕАКТИВОВ И РАСХОДНЫХ МАТЕРИАЛОВ

ОБОРУДОВАНИЕ

Аппарат для горизонтального электрофореза в агарозном геле и источник тока,

Документирующая система для визуализации результатов электрофореза,

Дозаторы для работы с объемами растворов в диапазоне от 0,1 до 1000 мкл,

Мешалка - Вортекс,

Микроскоп световой,

Проточный цитофлуориметр,

Спектрофотометр,

Термомиксер,

Термоциклер (ПЦР-амплификатор),

Холодильник с морозильной камерой,

Центрифуга с охлаждением на 14000 об/мин,

РЕАКТИВЫ

Тад-полимераза,
ТЫ-реагент,
ТЕ буфер,
в-меркаптоэтанол,
Агароза,
Вода деионизованная,
Изопропанол,
Ингибитор РНКаз,
Наборы праймеров,
Маркер молекулярного веса,
Моноклональные антитела,
Параформальдегид,
Растворы дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (дНТФ),
Реагент для создания градиента плотности ($1,077 \text{ г/см}^3$),
Раствор, лизирующий эритроциты,
Уксусная кислота,
Фенол-хлороформ-изоамиловый спирт (25:24:1),
Фосфатно-солевой буфер (рН=7,2-7,4),
Хлороформ,
Этанол 70%,
Этанол 96%.

РАСХОДНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Наконечники к дозаторам,
Пастеровские пипетки,
Пробирки центрифужные (объем 15 мл),
Пробирки для проточного цитофлуориметра,
Эппендорфы (объем 1,5 мл),

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДОВ

1. Метод определения аллореактивности донорских ЕК-клеток

1.1 Генотипирование антигенов ЫЪА-1 класса реципиента высокого разрешения.

1.2 Определение группы КЖ-литандов (С1, С2, В\У4) проводится с помощью базы данных [ПИр://^^^.ebl.ac.uk/lr/klg/11dap.Plт1](http://www.ebl.ac.uk/lr/klg/11dap/Plt1) на основании данных ЫЪА-1 генотипирования. Выявление типа отсутствующего К1К-лиганда (С1-, С2-, В\У4- или С1- и В\У4- или С2- и В\У4-).

1.3 Генотипирование и иммунофенотипирование соответствующего К1К-рецептора при выявлении отсутствующего К1К-лиганда. При отсутствии С2 - типирование К1К2БЫ, при отсутствии В\У4 - типирование К1К3БЫ. В случае отсутствия С1 - типирование К1К2ББ2/К1К2ББ3 является необязательным, так как ЕК-клетки всегда экспрессируют К1К2ББ2 или К1К2ББ3.

Для иммунофенотипического анализа из костного мозга, периферической крови или продукта цитафереза доноров на градиенте плотности выделяют мононуклеарные клетки (МНК), после чего их двукратно отмывают в фосфатно-солевом буфере (ФСБ), осаждая клетки центрифугированием (5 минут при 400д). Выделенные МНК обрабатывают раствором для лизиса эритроцитов в течение 10 минут в темноте при комнатной температуре. Затем клетки отмывают в ФСБ, центрифугируя 5 минут при 400д. При необходимости подсчитывают количество клеток под световым микроскопом с использованием уксусной кислоты. После процедуры лизирования эритроцитов клетки в количестве 200-500 тысяч инкубируют со специфическими моноклональными антителами к СБ3, СБ56 и К1К - СБ158а,п (клон

ЕВ6В), СБ158Ы1/Ы2О (клон ОЫ83), СБ158е1/е2 (клон 227), К1К №КВ1 (клон БХ9), К1К-ККАТ2 (клон БХ27), КЖ2Б1Л/2Б85 (клон 143211). Инкубирование проводят в темноте при комнатной температуре в течение 30 минут, после чего клетки отмывают в ФСБ. При необходимости образцы фиксируют в 1% параформальдегиде и хранят в холодильнике. Образцы клеток записывают и анализируют на проточном цитофлуориметре. Учитывают не менее 1 тысячи ЕК-клеток в каждом образце.

При отсутствии аллореактивности - проводится определение гаплотипа К1К-рецепторов (пункт 2).

2. Метод определения гаплотипа КШ генов доноров

2.1 Генотипирование К1К-рецепторов.

Генотипирование и определение гаплотипа К1К-рецепторов проводят на выделенных донорских МНК методом ПЦР на тотальной клеточной ДНК. Для выделения ДНК используется метод фенол-хлороформной экстракции из материала доноров. Для этого 1-3 млн клеток ресуспензируют в 1 мл лизирующего раствора и помещают в термошейкер на 2 часа при 55⁰С или на ночь при 37⁰С, при слабом помешивании. После этого к лизату добавляют 1 мл кислого фенол-хлороформа (фенол: хлороформ: изоамиловый спирт - 25:24:1, рН=7,0), встряхивают пробирку и центрифугируют при 14000 об/мин при 4⁰С в течение 10 минут. Не затрагивая интерфазу, отбирают верхнюю водную фазу, содержащую ДНК, добавляют к ней 1 мл изопропанола и перемешивают встряхиванием (при этом должно наблюдаться появление тяжёлой ДНК в растворе). Затем центрифугируют при 14000 об/мин и 4⁰С в течение 20-30 минут до появления полупрозрачного белёсого осадка. Удаляют супернатант и добавляют к осадку 1 мл 80%

этанол. Затем вортексируют и центрифугируют при 14000 об/мин и 4⁰С в течение 5 минут. После удаления супернатанта осадок высушивают в течение 5-10 мин (до полного испарения спирта), после чего добавляют к осадку 50-300 мкл ТЕ буфера или воды и оставляют в термошейкере при 37⁰С на 15-60 мин при слабом помешивании до полного растворения. После этого определяют качество выделенной ДНК. Препарат ДНК считается чистым, если отношение значений поглощения 260нм/280нм приблизительно равно 1,8 или отношение значений 260нм/230нм находится в интервале 1,8-2,2. Значение концентрации ДНК в исходном растворе (мкг/мкл) находят, умножая значение поглощения при длине волны 260 нм на К=20. Измерение поглощения проводят в кювете с длиной оптического пути 10 мм с использованием воды в качестве референсного значения. Образец ДНК разбавляют дистиллированной водой до концентрации 100 нг/мкл.

Праймеры и условия ПЦР амплификации анализируемых фрагментов приведены в таблице 1.

Таблица 1 - Используемые праймеры

Название праймера	Последовательность 5'-3'	Температура отжига, °С
2Б1ЛР	ССАТСАОТСОСАТОАСО	55,5
2Б1ЛК1	ССЛСТСОТЛТООЛОЛОТСЛТ	56,0
2Б1ЛК2	ААТОТТССОТТООАССТТООТ	57,5
2БЬ2Р1	ЛСТТССТТСТТ0СЛСЛ8Л0ЛЛ	0-56,5 С-57,0
2БЬ2К1	СССТОСЛОЛОЛЛССТЛСЛ	55,5
2БЬ3Р1	СТТСАТСОСТООТОСТО	55,0
2БЬ3К1	СЛОЛОЛСЛЛСТТТООЛТСЛ	55,0
2БЬ4Р1	СТОСЛТОСТОТ0ЛТТЛООТЛ	55,0
2БЬ4К1	СТОТТОООТСТСТТ0СТ	56,5
2БЬ5Р1	ТОССТСОЛООЛОЛСЛТ	56,5
2БЬ5К1	ТСЛТЛОООТ0ЛОТСЛТООЛО	55,7
3Б1ЛР1	ЛТУООТСССЛТ0ЛТ0СТ	С-55,0 Т-52,5
3Б1ЛК1	СТОЛОЛОЛЛ0ЛЛ0ОТТТСТСЛТЛТ0	56,0

3ББ2Р1	ТОСЛОЛЛССТЛСЛОЛТОТТЛТ	57,0
3ББ2К1	СТТОЛОТТТОЛССЛСЛСОС	57,0
3ББ3Р1	СЛСТОТООТОТСТОЛЛОЛС	58,0
3ББ3К1	ТСТСТОТОСЛОЛЛОЛЛОС	57,0
3Б81Р1	ООСЛОЛЛТЛТТССЛООЛО	54,5
3Б81К1	ООСЛСОСЛТСЛТООЛ	53,5
2Б81Р1	СТССЛТСЛОТСОСЛТОЛО	55,0
2Б81Р2	СТССЛТСЛОТСОСЛТОЛЛ	54,5
2Б81К	ЛООСССЛОЛОЛЛОЛЛОТТ	57,5
2Б82Р1	ТОСЛСЛОЛОЛОООЛЛОТЛ	57,0
2Б82К1	СОСТСТСТССТОССЛ	55,5
2Б83Р1	ТСЛСТСССССТЛТСЛОТТТ	54,5
2Б83К1	ОСЛТСТОТЛООТТССТССТ	56,0
2Б84Р1	ТССТОСЛЛОТТОТТОТСО	54,5
2Б84К1	ЛСОЛЛЛСЛЛОСЛОТООЛ	56,7
2Б85Р1	ЛОЛОЛОООЛСОТТТЛЛСС	56,0
2Б85К1	ООЛЛЛОЛОССОЛЛОСЛТС	56,0
2Б85КБ	СЛОЛОООТСЛСТОООС	56,0
2БР1Р1	ТСТОТТЛСТСЛСТСССССЛ	57,0
2БР1РЛ	ООЛЛЛОЛОССОЛЛОСЛТС	56,0
3БР1Р1	ЛОЛОТЛТТССОЛЛЛСЛССО	54,5
3БР1К1	СТОЛСЛЛСТОЛТЛООООЛЛ	56,0
Р1С-Р	ЛТОЛТОТТОЛССТТТССЛООО	58,0
Р1С-К	ЛТТОТТОТЛЛСТТТТТСЛТСЛОТТОС	56,7

ПЦР реакции проводятся при стандартных условиях: 1x ПЦР буфер с КС1, 1,5 mM МдС12, 0,2 mM дНТФ, 0,5 мкМ каждого праймера, Ш Тад полимеразы. ПЦР реакция для всех фрагментов включает 38 циклов амплификации. Тотальная клеточная ДНК вносится в реакцию в количестве 100 нг. Продукты ПЦР реакции анализируются методом электрофоретического разделения в 2% агарозном геле.

Для генотипирования К1К-рецепторов нужно установить плашку в держатель и удалить пленку. Отобрать 25 мкл ресуспензионного буфера и внести в лунку с негативным контролем. Развести образец ДНК в концентрации 75-125 нг/мкл (на типирование 1,8-3,1 мкг). Добавить 25

мкл разведенной ДНК к оставшемуся буферу (575 мкл) и смешать на вортексе.

Используется 25 мкл смеси буфер-ДНК на тест (21 тестовая лунка). Внести смесь буфер-ДНК в лунки. Плотнo закрепить пленку на плашку и осадить смесь буфер-ДНК на дно плашки легким встряхиванием или центрифугированием.

Режим ПЦР:

денатурация ДНК (пре-ПЦР) - 1 мин, 95⁰С, количество повтoров 1;
поддержка денатурированного состояния - 20 с, 94⁰С;
отжиг праймеров - 20 с, 63⁰С;
полимеризация - 90 с, 72⁰С. Количество повтoров - 28.

После проведения ПЦР провести электрофорез образцов в 2% агарозном геле при напряжении 4У/см, задокументировать при УФ-излучении.

К гаплотипу А относят донорский образец, экспрессирующий гены К1К2Б1Л, К1К2Б1Д К1К3БЫ, К1К3БЬ2 и К1К2Б84.

К маркерным генам центромерного региона относят гены К1К2Б82, 2БЬ2, 2БЬ3. Сеп Л/Л - позитивность только по К1К2БЬ3; Сеп А/В - позитивные 2БЬ3 и 2Б82 и/или 2БЬ2; Сеп В/В - позитивные 2Б82 и/или 2БЬ2 при негативном 2БЬ3. К маркерным генам теломерного региона относятся К1К3БЫ, 3Б81, 2Б81, 2Б84. Tel А/А - позитивность только по К1К3БЫ и 2Б84; Tel А/В - позитивный К1К3БЫ и 2Б84, а также 3Б81 и/или 2Б81; Tel В/В - отсутствие К1К3БЫ и/или 2Б84. Для разделения на центромерные и теломерные участки использовали алгоритм, представленный в таблице 2.

Таблица 2 - Алгоритм анализа гаплотипа центромерных и теломерных регионов К1К локуса.

Центромерный регион (К1К2Б82, 2БЬ2, 2БЬ3)

Сеп А/А	Только 2ББ3
Сеп А/В	2ББ3 и 2Б82 и/или 2ББ2
Сеп В/В	2Б82 и/или 2ББ2, нет 2ББ3
Теломерный регион (ЕЖ 3БЫ, 3Б81, 2Б81, 2Б84)	
Тел А/А	Только 3БЫ и 2Б84
Тел А/В	3БЫ и 2Б84 с 3Б81 и/или 2Б81
Тел В/В	Нет 3БЫ и/или 2Б84

2.2 Определение генотипа К1К-рецепторов (А/А или В/х). Для этого используют ресурс базы данных www.ebl.ac.uk/LrsIag/ёопог_б_соп1еп1.Ыш1.

2.3 Определение элементов К1К-В гаплотипа среди теломерного (Тел А/А или Тел А/В или Тел В/В) и центромерного (Сеп А/А или Сеп А/В или Сеп В/В) участков.

2.4 Определение количества элементов К1К-В гаплотипа (от 0 до 4) и определение числа активирующих генов (от 0 до 5).

2.5 Определение наличия активирующего К1К2Б81 при донорском С2/х ЫБА-1 генотипе (обученный К1К2Б81).

Возможные ошибки и осложнения

На фоне применения лекарственных средств, содержащих флуорохромные вещества, возможно привести к ошибочной трактовке результатов типирования

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**



**Методы определения аллореактивности и гаплотипа К1К-
рецепторов естественных киллерных клеток донора**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»

АВТОРЫ:

к.б.н. Шман Т.В., Вашкевич Е.П., Матвеевко М.А., Мигас А.А.,
Марейко Ю.Е., к.м.н. Минаковская Н.В., д.м.н., профессор, член-корр.
НАН Беларуси Алейникова О.В.

Минск, 2019