

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневиц

«28» Сентября 2019 г.

Регистрационный № 078-0519



**Методы определения аллореактивности и гаплотипа KIR-
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

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Д. Л. Пиневиц
28.06.2019.
Регистрационный № 078-0519

**МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АЛЛОРЕАКТИВНОСТИ И ГАПЛОТИПА KIR-
РЕЦЕПТОРОВ ЕСТЕСТВЕННЫХ КИЛЛЕРНЫХ КЛЕТОК ДОНОРА**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУ «Республиканский научно-практический
центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»

АВТОРЫ: канд. биол. наук Т. В. Шман, Е. П. Вашкевич, М. А. Матвеевко,
А. А. Мигас, Ю. Е. Марейко, канд. мед. наук Н. В. Минаковская, д-р мед. наук,
проф., чл.-кор. НАН Беларуси О. В. Алейникова

Минск 2019

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

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

HLA — human leukocyte antigen

KIR — killer Ig-like receptor

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложены методы определения аллореактивности и гаплотипа KIR-рецепторов естественных киллерных клеток донора при аллогенной ТГСК у пациентов со злокачественными новообразованиями и болезнями крови.

Выбор оптимального донора для аллогенной ТГСК с учетом данных об особенностях KIR-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 лиц со злокачественными новообразованиями.

Инструкция может быть использована в комплексе медицинских услуг, направленных на лечение пациентов с болезнями крови (D50-D89) и злокачественными новообразованиями лимфоидной, кроветворной и родственных им тканей (C81-C96), 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.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

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 1 000 мкл
Мешалка-вортекс
Микроскоп световой,
Проточный цитофлуориметр
Спектрофотометр
Термомиксер
Термоциклер (ПЦР-амплификатор)
Холодильник с морозильной камерой
Центрифуга с охлаждением на 14 000 об/мин

Реактивы

Тaq-полимераза
TRI-реагент
TE буфер
 β -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 г/см³)
Раствор, лизирующий эритроциты
Уксусная кислота
Фенол-хлороформ-изоамиловый спирт (25:24:1)
ФСБ (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)

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

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

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствует.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Метод определения аллореактивности донорских ЕК-клеток

1. Генотипирование антигенов HLA-I класса реципиента высокого разрешения.

2. Определение группы KIR-лигандов (C1, C2, Bw4) проводится с помощью базы данных <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/ligand.html> на основании данных HLA-I генотипирования. Выявление типа отсутствующего KIR-лиганда (C1-, C2-, Bw4- или C1- и Bw4- или C2- и Bw4-).

3. Гено- и иммунофенотипирование соответствующего KIR-рецептора при выявлении отсутствующего KIR-лиганда. При отсутствии C2 — типирование KIR2DL1, при отсутствии Bw4 — типирование KIR3DL1. В случае отсутствия C1 типирование KIR2DL2/KIR2DL3 является необязательным, так как ЕК всегда экспрессируют KIR2DL2 или KIR2DL3.

Для иммунофенотипического анализа из костного мозга, периферической крови или продукта цитафереза доноров на градиенте плотности выделяют МНК, после чего их двукратно отмывают в ФСБ, осаждая клетки центрифугированием (5 мин при 400g). Выделенные МНК обрабатывают раствором для лизиса эритроцитов в течение 10 мин в темноте при комнатной температуре. Затем

клетки отмывают в ФСБ, центрифугируя 5 мин при 400g. При необходимости подсчитывают количество клеток под световым микроскопом с использованием уксусной кислоты. После процедуры лизирования эритроцитов клетки в количестве 200-500 тыс. инкубируют со специфическими моноклональными антителами к CD3, CD56 и KIR — CD158a,h (клон EB6B), CD158b1/b2,j (клон GL183), CD158e1/e2 (клон Z27), KIR NKb1 (клон DX9), KIR-NKAT2 (клон DX27), KIR2DL1/2DS5 (клон 143211). Инкубирование производят в темноте при комнатной температуре в течение 30 мин, 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 1 000 ЕК-клеток в каждом образце.

При отсутствии аллореактивности определяют гаплотип KIR-рецепторов (пункт 2).

Метод определения гаплотипа KIR-генов доноров

1. Генотипирование и определение гаплотипа KIR-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 ч при 55 °С или на ночь при 37 °С, 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 14 000 об/мин 4 °С в течение 10 мин. Не затрагивая интерфазу, отбирают верхнюю водную фазу, содержащую ДНК, добавляют к ней 1 мл изопропанола и перемешивают встряхиванием (при этом должно наблюдаться появление тяжелой ДНК в растворе). Затем центрифугируют при 14 000 об/мин и 4 °С в течение 20-30 мин до появления полупрозрачного белёсого осадка. Удаляют супернатант и добавляют к осадку 1 мл 80 % этанола. Затем вортексируют и центрифугируют при 14 000 об/мин и 4 °С в течение 5 мин. После удаления супернатанта осадок высушивают в течение 5-10 мин (до полного испарения спирта), после чего добавляют к осадку 50-300 мкл TE буфера или воды и оставляют в термошейкере при 37 °С на 15-60 мин при слабом помешивании до полного растворения. После этого определяют качество выделенной ДНК. Препарат ДНК считается чистым, если отношение значений поглощения 260 нм/280 нм приблизительно равно 1,8 или 260 нм/230 нм 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 $K = 20$. Поглощение определяют 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, °C
2DL1F	CCATCAGTCGCATGACG	55,5
2DL1R1	CCACTCGTATGGAGAGTCAT	56,0
2DL1R2	AATGTTCCGTTGACCTTGGT	57,5
2DL2F1	ACTTCCTTCTGCACASAGAA	G-56,5 C-57,0
2DL2R1	CCCTGCAGAGAACCTACA	55,5
2DL3F1	CTTCATCGCTGGTGCTG	55,0
2DL3R1	CAGGAGACAACCTTTGGATCA	55,0
2DL4F1	CTGCATGCTGTGATTAGGTA	55,0
2DL4R1	CTGTTGAGGGTCTCTTGCT	56,5
2DL5F1	TGCCTCGAGGAGGACAT	56,5
2DL5R1	TCATAGGGTGAGTCATGGAG	55,7
3DL1F1	ATYGGTCCCATGATGCT	C-55,0 T-52,5
3DL1R1	CTGAGAGAGAAGGTTTCTCATATG	56,0
3DL2F1	TGCAGGAACCTACAGATGTTAT	57,0
3DL2R1	CTTGAGTTTGACCACACGC	57,0
3DL3F1	CACTGTGGTGTCTGAAGGAC	58,0
3DL3R1	TCTCTGTGCAGAAGGAAGC	57,0
3DS1F1	GGCAGAATATTCCAGGAGG	54,5
3DS1R1	GGCACGCATCATGGA	53,5
2DS1F1	CTCCATCAGTCGCATGAG	55,0
2DS1F2	CTCCATCAGTCGCATGAA	54,5
2DS1R	AGGGCCCAGAGGAAAGTT	57,5
2DS2F1	TGCACAGAGAGGGGAAGTA	57,0
2DS2R1	CGCTCTCTCCTGCCAA	55,5
2DS3F1	TCACTCCCCCTATCAGTTT	54,5
2DS3R1	GCATCTGTAGGTTCCCTCCT	56,0
2DS4F1	TCCTGCAATGTTGGTCG	54,5
2DS4R1	ACGGAAACAAGCAGTGGA	56,7
2DS5F1	AGAGAGGGGACGTTTAACC	56,0
2DS5R1	GGAAAGAGCCGAAGCATC	56,0
2DS5RD	CAGAGGGTCACTGGGC	56,0
2DP1F1	TCTGTTACTCACTCCCCCA	57,0
2DP1R1	GGAAAGAGCCGAAGCATC	56,0
3DP1F1	AGAGTATTCCGAAACACCG	54,5
3DP1R1	CTGACAACCTGATAGGGGGAA	56,0
PIC-F	ATGATGTTGACCTTTCCAGGG	58,0
PIC-R	ATTGTGTAACCTTTTCATCAGTTGC	56,7

ПЦР выполняют при стандартных условиях: 1х ПЦР буфер с KCl, 1,5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ дНТФ, 0,5 мкМ каждого праймера, 1U Taq полимеразы. ПЦР для всех фрагментов включает 38 циклов амплификации. Тотальная клеточная ДНК вносится в реакцию в количестве 100 нг. Продукты ПЦР анализируются методом электрофоретического разделения в 2 % агарозном геле.

Для генотипирования KIR-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 данную смесь в лунки. Плотно закрепить пленку на плашку и осадить смесь буфер-ДНК на дно плашки легким встряхиванием или центрифугированием.

Режим ПЦР

денатурация ДНК (пре-ПЦР) — 1 мин, 95 °С, количество повторов — 1;

поддержка денатурированного состояния — 20 с, 94 °С;

отжиг праймеров — 20 с, 63 °С;

полимеризация — 90 с, 72 °С. Количество повторов — 28.

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

К гаплотипу А относят донорский образец, экспрессирующий гены KIR2DL1, KIR2DL3, KIR3DL1, KIR3DL2 и KIR2DS4.

К маркерным генам центромерного региона принадлежат гены KIR 2DS2, 2DL2, 2DL3. Сен А/А — позитивный только по KIR 2DL3; Сен А/В — позитивные 2DL3 и 2DS2 и/или 2DL2; Сен В/В — позитивные 2DS2 и/или 2DL2 при негативном 2DL3. К маркерным генам теломерного региона относятся KIR 3DL1, 3DS1, 2DS1, 2DS4. Тел А/А — позитивность только по KIR3DL1 и 2DS4; Тел А/В — позитивный KIR3DL1 и 2DS4, а также 3DS1 и/или 2DS1; Тел В/В — отсутствие KIR3DL1 и/или 2DS4. Для разделения на центро- и теломерные участки использовали алгоритм, представленный в таблице 2.

Таблица 2 — Алгоритм анализа гаплотипа центро- и теломерных регионов KIR локуса

Центромерный регион (KIR 2DS2, 2DL2, 2DL3)	
Сен А/А	Только 2DL3
Сен А/В	2DL3 и 2DS2 и/или 2DL2
Сен В/В	2DS2 и/или 2DL2, нет 2DL3
Теломерный регион (KIR 3DL1, 3DS1, 2DS1, 2DS4)	
Тел А/А	Только 3DL1 и 2DS4
Тел А/В	3DL1 и 2DS4 с 3DS1 и/или 2DS1
Тел В/В	Нет 3DL1 и/или 2DS4

2. Определение генотипа KIR-рецепторов (А/А или В/х). Для этого используют ресурс базы данных www.ebi.ac.uk/ipd/kir/donor_b_content.html.

3. Определение элементов KIR-B гаплотипа среди теломерного (Tel A/A или Tel A/B или Tel B/B) и центромерного (Cen A/A или Cen A/B или Cen B/B) участков.

4. Определение количества элементов KIR-B гаплотипа (от 0 до 4) и числа активирующих генов (от 0 до 5).

5. Выявление наличия активирующего KIR2DS1 при донорском C2/x HLA-I генотипе (обученный KIR2DS1).

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ ИСПРАВЛЕНИЯ

На фоне применения лекарственных средств, содержащих флуорохромные вещества, возможна ошибочная трактовка результатов типирования.