

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ В.А. Ходжаев

16.03.2011 г.

Регистрационный № 174-1110

МЕТОД ПОДБОРА ЕК-АЛЛОРЕАКТИВНОГО ДОНОРА ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ГАПЛОИДЕНТИЧНЫХ ТРАНСПЛАНТАЦИЙ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии и гематологии»

АВТОРЫ:

Канд. биол. наук Шман Т.В., Вашкевич Е.П., Мигас А.А., Марейко Ю.Е.,
Минаковская Н.В., д-р мед. наук, проф., чл.-кор. Алейникова О.В.

Минск 2010

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Естественные киллерные (ЕК) клетки являются основным типом клеток врожденного иммунитета и защищают организм от вирусов, бактерий и опухолевой трансформации. Активность ЕК-клеток регулируется различными семействами рецепторов: киллерные иммуноглобулин-подобные (KIR) рецепторы, лектиновые рецепторы С-типа, рецепторы естественной цитотоксичности и др.

Семейство KIR-генов человека располагается в лейкоцит-рецепторном комплексе (LRC) на хромосоме 19q13.4. Рецепторы этого семейства отличаются по количеству иммуноглобулинподобных доменов, определяющих специфичность их связывания с лигандом, и длиной цитоплазматического хвоста. В названиях таких рецепторов количество иммуноглобулиновых доменов обозначают цифрами (например, 2D), а длину хвоста – буквами L (длинный) или S (короткий).

При изучении цитотоксического эффекта ЕК-клеток против клеток лимфомы была предложена гипотеза «missing self», согласно которой ЕК-клетки активируются и выполняют цитотоксическую функцию при выявлении опухолевых клеток с низкой или отсутствующей экспрессией собственных МНС. Последующие работы, выполненные как с использованием моделей животных, так и в клинических экспериментах с лейкозами у взрослых, привели к формулировке новой концепции «идеальной несовместимости» для сознательного поиска донора с такой несовместимостью, которая бы приводила к максимальной активации противоопухолевых свойств ЕК-клеток.

В последнее десятилетие все больше проводится HLA-гаплоидентичных ТГСК для лечения опухолей кроветворной системы высокого риска. Это связано с улучшением результатов гаплотрансплантаций благодаря разработке протоколов высоко иммуносупрессивного немиелоаблативного кондиционирования, совершенствованию методов афереза для получения высоких доз CD34+ клеток в трансплантате, улучшенной профилактике реакции трансплантат-против-хозяина.

При выборе донора с «идеальной несовместимостью» для гаплотрансплантаций в последнее время учитывают наличие аллореактивности донорских ЕК-клеток. Они считают аллореактивными по отношению к клеткам реципиента, если ингибиторные KIR-рецепторы ЕК-клеток донора не имеют соответствующих лигандов (в роли которых выступают некоторые молекулы HLA I класса) на клетках реципиента.

Поскольку семейство KIR и HLA генов располагается на разных хромосомах, совпадение по HLA не означает совпадения по KIR. Следовательно, для процедуры выбора донора по критерию ЕК-аллореактивности необходимо типирование HLA по I классу для донора и реципиента, а также типирование KIR-рецепторов донора методом полимеразной цепной реакции и/или определение экспрессии KIR-рецепторов на ЕК-клетках донора методом проточной цитофлуориметрии.

Целью разработанной инструкции являлось описание способа подбора ЕК-аллореактивного донора для гаплоидентичных трансплантаций гемопоэтических стволовых клеток.

Область применения способа – гематология, трансплантология. Инструкция может быть использована на республиканском уровне в центрах с отделениями трансплантации.

Медико-социальной значимостью проведения гаплотрансплантаций от ЕК-аллореактивного донора являются лучшее приживление трансплантата, редукция проявлений реакции трансплантат-против-хозяина, снижению риска развития рецидивов, что приведет к улучшению общих показателей выживаемости.

Показанием для проведения гаплотрансплантаций от ЕК-аллореактивного донора является необходимость проведения аллогенной ТГСК для пациентов со злокачественными заболеваниями крови высокого риска при отсутствии совместимого родственного или неродственного донора.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, МАТЕРИАЛОВ И РЕАКТИВОВ

ОБОРУДОВАНИЕ

Центрифуга

Центрифуга с охлаждением на 14000 об/мин

ПЦР боксы

Вакуумный аспиратор

Вортекс

Спектрофотометр

Термомиксер

Термоциклер

Аппарат для горизонтального электрофореза в агарозном геле

Документирующая система

Микроскоп

Проточный цитофлуориметр

Морозильник -20 °С

Морозильник -70 °С

Дозаторы

РАСХОДНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Наконечники для дозаторов с аэрозольными барьерами объемом от 0,1 до 1000 мкл

Центрифужные пробирки (объем 15 мл)

Пробирки для проведения ПЦР (объем 0,2 мл)

Пробирки для проточного цитофлуориметра (объем 5 мл)

Пастеровские пипетки

Камера Горяева

РЕАГЕНТЫ

Реагент для создания градиента плотности (1,077 г/см³)

TRI-reagent

Тaq-полимераза

β-меркаптоэтанол
 Агароза
 Вода деионизованная
 Изопропанол
 Ингибитор РНКаз
 Маркер молекулярного веса
 Обратная транскриптаза
 Растворы дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (дНТФ)
 Набор праймеров
 Рэндом гексамеры
 Фенол-хлороформ-изоамиловый спирт (25:24:1)
 Хлороформ
 Этанол 70%
 Этанол 96%
 Фосфатно-солевой буфер (рН=7,2-7,4)
 Раствор, лизирующий эритроциты
 Моноклональные антитела
 Параформальдегид

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Типирование KIR-генов методом полимеразной цепной реакции

Типирование KIR-рецепторов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) проводилось на тотальной клеточной ДНК, выделенной методом фенол-хлороформной экстракции из периферической крови или костного мозга доноров.

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

Таблица 1

Праймеры и условия ПЦР амплификации генов

Аmplифицируемый фрагмент	Название праймера	Последовательность праймера (3'-5')	Температура отжига (°C)
KIR2DL1	Fa517d	gttggtcagatgcatgtttgaa	56,2
	Rc621d	cctgccaggtcttgcg	
KIR2DL2	Fcon750d	aaaccttctctctcagccca	55,2
	Rt854	gccctgcagagaacctaca	
KIR2DL3	Fcon1254d	agaccctcaggaggtga	52,2
	Rt1375	caggagacaactttggatca	
KIR3DL1	Ftt624d	tccatcggtcccatgatgtt	57
	Rt697d	ccacgatgtccagggga	
Внутренний контроль	FDRA360	gaggtaactgtgctcacgaacagc	—
	RDRA595	ggtccataccccagtgttgagaag	

ПЦР проводилась при стандартных условиях: 1x ПЦР буфер с KCl, 1,5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ дНТФ, 0,5 мкМ каждого праймера, 1U Taq полимеразы. ПЦР для

всех фрагментов включала 38 циклов амплификации. Тотальная клеточная ДНК вносилась в реакцию в количестве 100 нг.

Для определения рецепторов KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3 использовался внутренний положительный контроль при проведении ПЦР с использованием праймеров FDRA360 и RDRA595, специфичных к непалиморфной последовательности гена *HLA-DRA*.

Продукты ПЦР анализировались методом электрофоретического разделения в 2%-м агарозном геле.

Определение экспрессии KIR-рецепторов на ЕК-клетках донора методом трехцветной проточной цитофлуориметрии

Для иммунофенотипического анализа KIR рецепторов из костного мозга или периферической крови доноров на градиенте плотности выделяли мононуклеарные клетки, после чего их двукратно отмывали в фосфатно-солевом буфере (ФСБ), осаждая клетки центрифугированием (5 мин при 300g). Затем клетки (200-500 тыс.) инкубировали со специфическими моноклональными антителами к CD3-FITC, CD56-PE-cy5 и KIR рецепторам, меченным PE. Образцы инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 30 минут. После инкубации с антителами клетки дважды отмывали в ФСБ, центрифугируя 5 мин при 300g.

Для определения поверхностной экспрессии ингибиторных KIR на ЕК-клетках использовали следующие моноклональные антитела: для KIR3DL1 – клоны DX-9 и Z27; для KIR2DL1 – клоны EB6B и HP-3E4; для KIR2DL2/KIR2DL3 – клоны CH-L, GL183 и DX-27.

Исследования выполняли на многопараметрическом проточном лазерном цитофлуориметре с использованием программ для анализа данных. Записывали показатели от 50 до 100 тыс. клеток в каждом образце. По показателям прямого и бокового светорассеивания выделяли регион лимфоцитов, затем ЕК-клетки выделяли по фенотипу CD3-CD56+, после чего среди региона ЕК-клеток анализировали экспрессию ингибиторных KIR.

HLA типирование донора и реципиента

HLA типирование донора и реципиента на первом этапе применяли серологическим методом и/или проводили типирование высокого разрешения.

HLA типирование выполнялось в лаборатории иммунологического типирования органов и тканей РНПЦ ГТ МЗ РБ или лаборатории Европейского банка доноров.

Анализ аллореактивности ЕК-клеток донора

HLA-C лиганды можно разделить на две группы (C1 и C2) по их аминокислотной последовательности в положениях 77 и 80 в α -1 спирали HLA-C молекулы. Среди двух групп аллелей HLA-B (Bw4 и Bw6), которая также определяется аминокислотами в положениях 77 и 80, только HLA-Bw4 аллель является лигандом для KIR3DL1.

Таким образом, на основании результатов типирования пациента по HLA-I класса определяли наличие лигандов (C1, C2, Bw4 или Bw6) для KIR рецепторов ЕК-клеток донора. Принадлежность HLA аллелей к группам KIR лигандов (C1,

C2, Bw4) определяли по сведениям базы данных The Immuno Polymorphism Database (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/ligand.html>).

Схематично взаимодействие KIR-рецепторов и их лигандов, имеющих значение в прогнозировании аллореактивности ЕК-клеток, представлено в табл. 2.

Таблица 2

Ингибиторные KIR рецепторы и их лиганды

KIR Рецепторы	Лиганды		
	Ген	HLA-I	Специфичность
KIR2DL1	HLA-C группа 2	Asp77/Lys80	Cw2, 4, 5, 6, 15, 17, 18
KIR2DL2/KIR2DL3	HLA-C группа 1	Ser77/Asn80	Cw1, 3, 7, 8, 12, 14, 16
KIR3DL1	HLA-Bw4	Asp77/Thr80, Asn77/Ile80, Asn77/Thr80, Ser77/Thr80	B27, B44 и др.

Анализ аллореактивности ЕК-клеток выполняли согласно модели «рецептор-лиганд». По этой модели ЕК-клетки донора считали аллореактивными по отношению к клеткам реципиента в случае, если хотя бы один из исследуемых ингибиторных KIR рецепторов донора (KIR2DL1 и/или KIR2DL2/DL3 и/или KIR3DL1) не имел соответствующего лиганда (HLA-C2 и/или HLA-C1 и/или HLA-Bw4 соответственно) на клетках реципиента.

Алгоритм подбора ЕК-аллореактивного донора

1. На основании результатов HLA-I типирования реципиента определить типы KIR-лигандов. Возможны следующие варианты:

- C1+C2+Bw4+, C1+C2+Bw6+,
- C1+C1+Bw4+, C1+C1+Bw6+,
- C2+C2+Bw4+, C2+C2+Bw6.

Для пациентов с вариантом C1+C2+Bw4+ подбор ЕК-аллореактивного донора невозможен, так как все три типа лигандов для рецепторов ЕК-клеток присутствуют на клетках реципиента.

2. Для всех групп пациентов (кроме C1+C2+Bw4+) определить экспрессию KIR-рецепторов (KIR2DL1, KIR2DL2/DL3, KIR3DL1) на ЕК-клетках потенциальных доноров методами полимеразной цепной реакции или проточной цитофлуориметрии.

3. Если по данным ПЦР экспрессия KIR генов позитивна, а по данным цитофлуориметрии – белок не экспрессируется или негативна, для анализа аллореактивности использовали данные проточной цитофлуориметрии.

Перечень возможных осложнений при выполнении метода и пути их устранения

Возможные сложности в определении экспрессии KIR-рецепторов и способы их устранения изложены в табл. 3.

Таблица 3

Возможные сложности в определении экспрессии KIR-рецепторов и способы их устранения

Проблемы	Способы разрешения
Недостаточное количество донорских клеток для одновременного проведения ПЦР анализа и иммунофенотипирования KIR-рецепторов	Определить экспрессию KIR-рецепторов с помощью одного метода
Низкое процентное содержание ЕК-клеток в образце крови или костном мозге донора, не позволяющие достоверно определить экспрессию KIR-рецепторов методом проточной цитофлуориметрии	Для анализа экспрессии рецепторов записывать показатели не менее 100 тысяч клеток в каждом образце
ПЦР реакция не проходит	Проверить качество ДНК, очистить методом высаливания
По данным ПЦР экспрессия KIR генов позитивна, по данным цитофлуориметрии – негативна	Провести анализ повторно, если результат подтвердится, то учитывать данные цитофлуориметрии