

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

«УТВЕРЖДАЮ»



Первый заместитель Министра
Д.Л. Пиневиц
2012 г.

Регистрационный № 114-1111

МЕТОД ОЦЕНКИ СПЕЦИФИЧЕСКОГО ИММУННОГО ОТВЕТА НА АУТОИММУНОТЕРАПИЮ ДЕНДРИТНЫМИ КЛЕТКАМИ ПАЦИЕНТОВ, СТРАДАЮЩИХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Инструкция по применению

Учреждения-разработчики:

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова»

Авторы: кандидат медицинских наук Гончаров А.Е., доктор медицинских наук, профессор Титов Л.П., доктор медицинских наук, профессор Путырский Л.А., Кошелев С.В.

Минск, 2011

Сокращения и условные обозначения

АСК – антигенспецифические клетки

ИНФ- γ – интерферон- γ

РМЖ – рак молочной железы

ФМА – форбол-12-миристат-13-ацетат

CD – cluster of differentiation (кластер дифференцировки)

DPBS – Dulbecco's Phosphate-buffered saline (фосфатно-солевой буферный раствор Дальбека)

В представленной инструкции изложена адаптация метода оценки специфического клеточного иммунного ответа у пациентов, страдающих РМЖ, по приросту антигенспецифических Т-лимфоцитов. Инструкция предназначена для специалистов по проточной цитометрии.

1 Показания к применению

Оценка функциональной способности иммунной системы пациентов с РМЖ развивать противоопухолевый Т-клеточный иммунный ответ путем определения прироста антигенспецифических CD3⁺ Т-лимфоцитов в результате иммунотерапии аутологичными дендритными клетками, праймированными пептидами мутантного р53.

2 Перечень необходимого оборудования, реагентов и расходных материалов

2.1 Оборудование:

1. ламинарные боксы II класса защиты с бактерицидной лампой;
2. автоматические дозаторы на разные объемы;
3. центрифуга низкоскоростная (1000–3000 об/мин);
4. холодильник с рабочей температурой +2–8⁰С с морозильной камерой;
5. термостат с рабочей температурой +37⁰С;
6. проточный цитофлуориметр;
7. контейнеры для хранения и транспортировки пробирок с кровью;
8. штативы для пробирок;
9. мерные колбы для приготовления растворов;
10. емкости для сброса биологического материала.

2.2 Расходные материалы:

1. наконечники пластиковые на 1–5 мл, 0,01–0,1 мл, 0,1–1,0 мл, 0,5–10 мл;
2. одноразовые полипропиленовые пробирки объемом 1,5 мл;

3. пробирки для цитофлуориметра;
4. вакутайнеры с гепарином.

2.3 Реагенты:

1. жидкая питательная среда RPMI-1640 с HEPES;
2. ФМА, иономицин, монензин;
3. синтетические короткоцепочечные пептиды мутантного протеина p53: p53 – p53₆₅₋₇₃ RMPEAAPPV, p53₂₆₄₋₂₇₂ LLGRNSFEV, p53₁₃₉₋₁₄₇ KLCPVQLWV, p53₁₀₃₋₁₁₁ YLGSYGFRL;
4. моноклональные антитела к CD3, CD69, ИНФ- γ и изотипические контроли, конъюгированные с флуорохромами;
5. лизирующий раствор;
6. фиксирующий раствор;
7. пермеабелизирующий раствор;
8. DPBS.

Панель антител подбирают таким образом, чтобы антитела к CD69 и ИНФ- γ были конъюгированы с наиболее яркими из доступных флуорохромов: фикоэритрином (PE), аллофикоцианином (APC), тандемом фикоэритрина и Cy7 (PE-Cy7). Антитело к CD3-молекуле может быть конъюгировано с любым другим флуорохромом, который позволяет четко идентифицировать популяцию CD3⁺ клеток, и требует минимальной спектральной компенсации (например, CD3 – APC, CD69 – PE, ИНФ- γ – PE). Изотипическое антитело должно быть того же изотипа, что и антитело к ИНФ- γ и конъюгировано с тем же флуорохромом. Для уточнения списка флуорохромов, пригодных для использования, см. инструкцию по эксплуатации проточного цитофлуориметра.

2.4 Приготовление растворов

Растворы готовят согласно приведенным ниже прописям.

DPBS (1× раствор, 1 л):

- фосфат калия однозамещенный безводный – 0,2;
- хлорид калия – 0,2;
- фосфат натрия двузамещенный двенадцативодный – 2,9;
- хлорид натрия – 8,0;
- тетранатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты – 0,2;
- азид натрия – 1,0;
- воды аналитического качества до 1 л.

Лизирующий раствор (10× раствор, 100 мл):

- хлорид аммония – 8,29;
- гидрокарбонат калия – 1,0;
- тетранатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты – 0,37;
- воды аналитического качества до 100 мл.

Фиксирующий раствор (1× раствор, 100 мл):

- параформальдегид – 4,0;
- фосфат калия однозамещенный безводный – 0,2;
- хлорид калия – 0,2;
- фосфат натрия двузамещенный двенадцативодный – 2,9;
- хлорид натрия – 8,0;
- воды аналитического качества до 100 мл.

Пермеабилзирующий раствор (1× раствор, 100 мл):

- сапонин – 0,3;
- фосфат калия однозамещенный безводный – 0,2;
- хлорид калия – 0,2;

- фосфат натрия двузамещенный двенадцативодный – 2,9;
- хлорид натрия – 8,0;
- воды аналитического качества до 100 мл.

2.5 Средства индивидуальной защиты и дезинфектанты:

1. лабораторный халат;
2. латексные перчатки;
3. «септоцид» или иной спиртсодержащий раствор, предназначенный для обработки рук персонала;
4. «полидез» или иной дезинфектант для инактивации отходов.

3 Описание использования метода

3.1 Забор материала

Для проведения исследования используют цельную кровь пациентов с РМЖ. Забор крови в количестве 5 мл проводят утром натощак из локтевой вены в вакутайнер с гепарином. Закрытый вакутайнер с кровью несколько раз переворачивают для смешивания крови с антикоагулянтом.

3.2. Правила транспортировки и хранения материала

Вакутайнеры с кровью доставляют в лабораторию непосредственно в день забора материала. Транспортировку осуществляют в соответствии с требованиями по перевозке биологического материала в специальных контейнерах согласно инструкции «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов 1-4 групп патогенности» №11-713-2002. Кровь хранят до использования не более 4 часов при комнатной температуре.

3.3 Активация лимфоцитов периферической крови

В пробирки на 1,5 мл вносят по 500 мкл крови и добавляют: 1) ФМА (25 нг/мл) и иономицин (1 мкг/мл) в качестве положительного контроля; 2)

100 мкл DPBS в качестве отрицательного контроля; 3) смесь пептидов мутантного p53 (по 10 мкг/мл каждого). Доводят содержимое пробирок средой RPMI-1640 до 1 мл и культивируют суспензию 2 часа при температуре 37°C. Через 2 часа в пробирки добавляют монензин (10 мкг/мл) и инкубируют 4 часа при температуре 37°C.

3.4 Пробоподготовка

Для каждой пробы отбирают 4 пробирки для цитофлуориметра. Маркируют пробирки №1–4. В каждую пробирку добавляют антитела к CD3 в необходимом количестве (согласно инструкции по применению антител). Затем в пробирки добавляют: №1 – антитело к CD69 и 200 мкл крови, инкубированной с ФМА (контроль активации); №2 – 200 мкл крови, инкубированной в присутствии DPBS (отрицательный контроль для оценки спонтанной продукции ИНФ- γ , «контрольный образец»); №3 – 200 мкл крови, инкубированной с ФМА (положительный контроль для проверки этапа пробподготовки); №4 – 200 мкл крови, инкубированной с пептидами («опытный образец»). Тщательно перемешивают пробирки и инкубируют смесь в течение 15 минут при 2–8°C в темноте. Затем эритроциты лизируют в 3 мл лизирующего раствора в течение 15 минут при комнатной температуре в темном месте. Клетки центрифугируют 5 минут при 200 g; супернатант удаляют переворачиванием пробирки. Отмывают клетки в 3 мл DPBS; супернатант удаляют переворачиванием пробирки.

Учитывают результаты экспрессии молекулы CD69 (пробирка №1) на проточном цитофлуориметре. Клетки в пробирках №2–4 фиксируют в течение 10 минут в 500 мкл фиксирующего раствора. Затем в каждую пробирку добавляют по 2 мл DPBS; центрифугируют 5 минут при 200 g для осаждения клеток; супернатант удаляют переворачиванием пробирки.

Ресуспендируют клетки в 500 мкл пермеабилзирующего раствора, инкубируют 15 минут, после чего отмывают клетки в 3 мл DPBS.

Для каждой пробы отбирают дополнительно 3 пробирки для цитофлуориметра. Маркируют пробирки №2И, 3И, 4И для постановки изотипического контроля («изотипический контрольный образец»). Разделяют суспензию клеток в пробирках №2–4 на две равные части и переносят их в пробирки №2И, 3И, 4И соответственно.

В пробирки №2–4 добавляют моноклональное антитело к ИНФ- γ , а в пробирки №2И, 3И, 4И – изотипическое антитело и инкубируют 30 минут при 2–8°C. По истечении времени инкубации клетки отмывают от несвязавшихся антител в 2 мл DPBS, ресуспендируют клетки в 300 мкл DPBS и учитывают результаты на проточном цитофлуориметре.

Вначале учитывают контрольный образец (пробирки №2И и №2), затем образец клеток, активированных ФМА (пробирки №3И и №3), затем – опытный образец (пробирки №4И и №4). На цитограмме CD3/SSC выделяют регион CD3⁺ лимфоцитов. Создают гисто- или цитограмму флуоресценции для анализа ИНФ- γ и, анализируя пробирку с изотипическим контрольным образцом (пробирка с литерой «И»), отмечают уровень фоновой флуоресценции. Затем анализируя пробирку с клетками, инкубированными с антителом к ИНФ- γ , регистрируют относительное число клеток, содержащих ИНФ- γ .

Алгоритм проведения этапов пробоподготовки также представлен на рисунке.

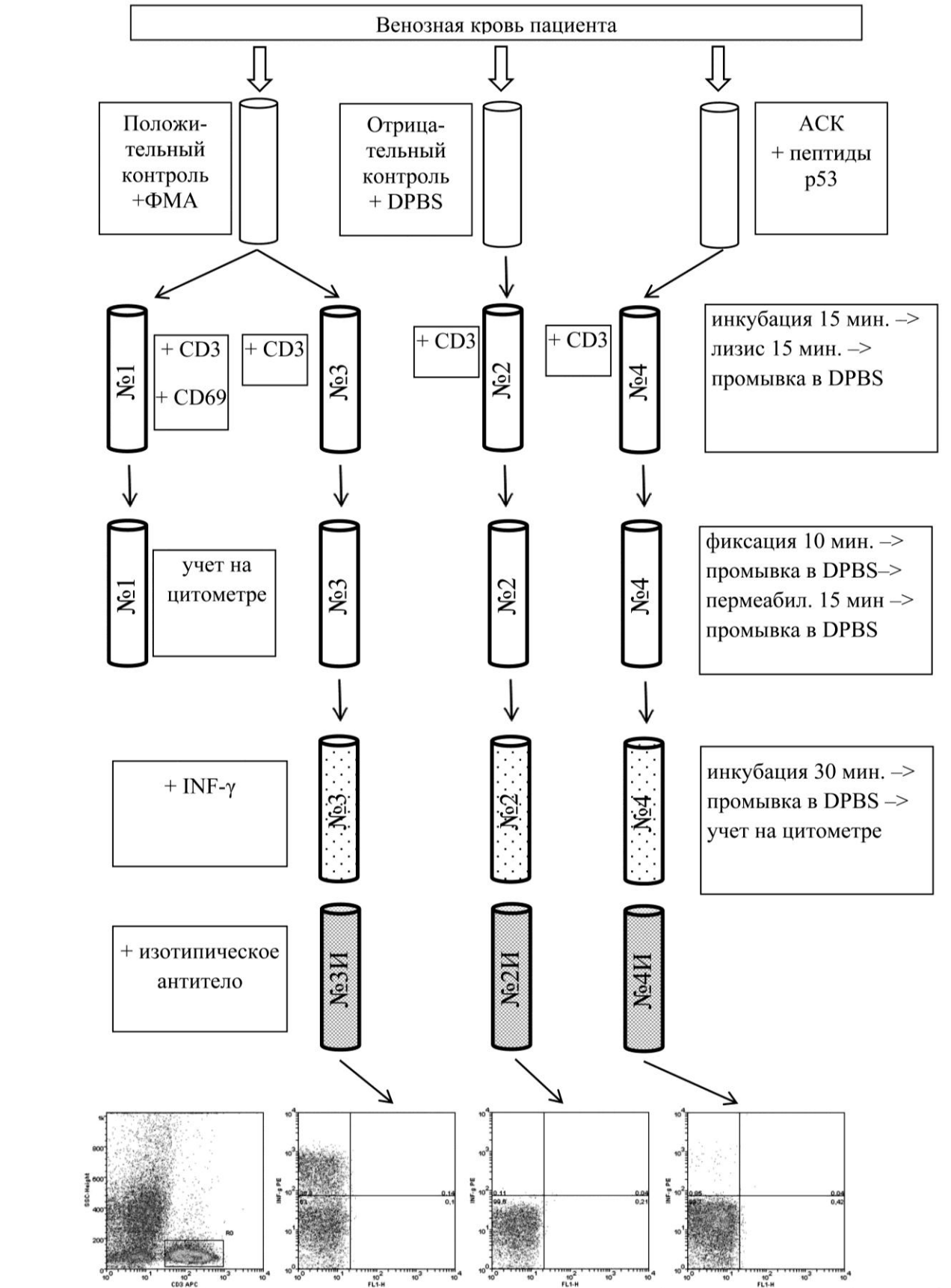


Рисунок – Алгоритм проведения этапов пробоподготовки

3.5 Анализ полученных данных

Вначале анализируют относительное число активированных ФМА клеток (контроль активации). Экспрессия молекулы CD69 на активированных ФМА и иономицином CD3⁺ Т-лимфоцитах должна составлять более 80%. В случае, если экспрессия молекулы составляет менее 80%, эксперимент повторяют с этапа 3.1.

Анализируют число Т-клеток, продуцирующих ИНФ- γ при сокультивировании с ФМА (положительный контроль). Число ИНФ- γ ⁺ Т-лимфоцитов должно составлять более 5%. Если данный показатель оказывается ниже 5%, эксперимент рекомендуется повторить с этапа 3.1.

Для расчета АСК, от числа Т-лимфоцитов, продуцирующих ИНФ- γ под действием пептидов p53 (опытный образец), вычитают число Т-лимфоцитов, спонтанно продуцирующих ИНФ- γ (контрольный образец). Таким образом, расчет числа АСК проводят по следующей формуле:

$$\text{АСК} = (\text{№4} - \text{№4И}) - (\text{№2} - \text{№2И})$$

где №x – число CD3⁺ИНФ- γ ⁺ клеток в пробирке №x.

С целью анализа динамики иммунного ответа регистрируют число АСК до проведения иммунотерапии, в течение месяца после завершения всех этапов иммунотерапии, и через год после окончания иммунотерапии.

Иммунный ответ на терапию дендритными клетками сопровождается увеличением числа антигенспецифических Т-лимфоцитов. Прирост числа АСК рассчитывают по формуле:

$$\text{прирост АСК} = \text{АСК}_{\text{после терапии}} - \text{АСК}_{\text{до терапии}} / \text{АСК}_{\text{до терапии}} \times 100\%$$

Прирост числа АСК от 0 до 20% расценивают как слабый, 30–50% – умеренный, > 50% – значительный.

В случае, если после проведения стандартного курса иммунотерапии

выявлен слабый прирост АСК, рекомендуется назначить дополнительный курс иммунотерапии дендритными клетками.

4 Перечень возможных ошибок при выполнении метода и пути их устранения

В таблице представлены проблемы и методические ошибки, которые могут возникнуть при выполнении метода с описанием причин возникновения и путей их устранения (таблица).

Таблица – Возможные ошибки или осложнения при выполнении метода и пути их устранения

Проблема	Возможная причина	Пути устранения
Отсутствие активации клеток	Неправильные условия хранения веществ	Правильно готовить и хранить растворы
	Неподходящий антикоагулянт	Использовать только гепарин (цитрат натрия, ЭДТА не используют)
	Неподходящие условия культивирования	Тщательно соблюдать режим инкубации
Слабая интенсивность свечения, плохое разделение популяций	Низкая концентрация антител	Подобрать достаточную концентрацию
	Клетки не отмыты после этапа пермеабилзации	Тщательно отмывать клетки в DPBS
	Непригодные растворы	Правильно готовить растворы, соблюдать условия хранения.
	«Выгорание» флуорохромов	Инкубация клеток в темноте, сведение времени манипуляций с клетками к минимуму
	«Тусклые» флуорохромы	Использовать более яркие флуорохромы (PE, APC, PE-Cy7)
	Плохое смешивание антител с пробой	Тщательно смешивать антитела с клетками

Проблема	Возможная причина	Пути устранения
Высокая фоновая флуоресценция	Отсутствие отмывки клеток после этапа фиксации	Тщательно отмывать клетки в DPBS
	Отсутствие отмывки антител	
	Чрезмерно длительная фиксация и пермеабелизация	Следить за временем инкубации
	Наличие свободных флуорохромов в растворах антител	Использовать другие антитела
	Чрезмерная концентрация изотипического антитела	Подобрать концентрацию антитела
Чрезмерные потери клеток	Недостаточное время центрифугирования	Следить за временем центрифугирования
	Некорректное удаление супернатанта	Правильно удалять супернатант
	Непригодные растворы, длительное время инкубации	Следовать пунктам инструкции
	Адгезия клеток	Работать с охлажденными растворами
Недостаточный лизис эритроцитов	Неправильно приготовленный раствор	Правильно готовить и хранить раствор
	Некорректный температурный режим	Лизис при комнатной температуре
	Недостаточное перемешивание	Двухкратное перемешивание на вортексе

5 Противопоказания для применения

Отсутствуют.