

1. Метод персонализированной иммунотерапии. Получение аутологичного препарата иммунопептидов из крови пациента. Патент № 2414228 «Способ персонифицированной иммунотерапии»

Препарат аутологичных иммунопептидов (противомикробных нейтрофильных пептидов) получают путем выделения лейкоцитов из периферической крови, стимуляции их митогеном (например, фитогемагглютинином), культивированием в течение 20-24-х часов, получением аутологичного супернатанта, его стерилизации и оценки биологической активности.

- Для получения препарата аутологичных иммунопептидов у пациента забирают 20-40 мл крови из локтевой вены в стерильную пробирку, содержащую антикоагулянт (из расчета 25 ЕД/мл крови).
- Периферическую кровь смешивают в соотношении 1:5 с 10% раствором желатина и отстаивают в течение 10 мин при комнатной температуре, а затем 30 мин при 37°C. Лейкомассу собирают.
- Клетки отмывают 0,9% раствором хлорида натрия, центрифугируя их в течение 10 мин при 200g.
- Определяют общее количество выделенных лейкоцитов, готовят концентрацию $20 \cdot 10^6$ клеток в 1,0 мл бесцветной среды 199.
- Для стимуляции лейкоцитов используют митогены (ФГА или конканавалин А) в дозе 10-15 мкг/мл.
- Через 3 часа стимулятор удаляют, а клетки трижды отмывают от стимулятора и культивируют в бесцветной культуральной среде 199 в течение 20-24-х часов.
- По окончании культивирования надосадочную жидкость собирают, стерилизуют фильтрацией через фильтры (Millipore-QS, США, диаметр пор 0,22 мкм).

2. Методика иммуноферментного анализа

Для определения концентрации цитокинов и других биологически активных веществ белковой природы в различных биологических жидкостях используются коммерческие наборы для иммуноферментного анализа (ИФА) различных фирм-производителей. Тест основан на методе твердофазного иммуноферментного анализа.

Анализ проводился согласно следующей методике:

- В лунки, предназначенные для стандартов, вносят 50 мкл Инкубационного буфера, а в лунки, предназначенные для образцов, вносят 50 мкл Разбавляющего буфера для стандартов. Затем добавляют 100 мкл стандартов, образцов или контролей в соответствующие лунки. Все пробы анализируются в дублях. Планшет закрывают пленкой и инкубируют 2 часа при комнатной температуре.
- После окончания инкубации осторожно снимают плёнку, помещая её затем в дезинфицирующий раствор. Стрипы промывают 4 раза промывающим раствором (раствор готовят в соответствии с методическими рекомендациями из 25-кратного концентрата ФСБ-Т и дистиллированной воды). При этом в каждую лунку вносят не менее 300 мкл раствора в процессе одного промывания. Раствор из лунок тщательно удаляют постукиванием планшета по фильтровальной бумаге.

- Затем в каждую лунку вносят 100 мкл биотинилированных антител к определяемому веществу. Планшет закрывают пленкой и инкубируют 1 час при комнатной температуре. По окончании инкубации промывают стрипы 4 раза и удаляют влагу, как описано выше.
- После в каждую лунку вносят 100 мкл рабочего раствора конъюгата стрептавидин-пероксидазы. Планшет закрывают пленкой и инкубируют 30 мин при комнатной температуре. По окончании инкубации промывают стрипы 4 раза и удаляют влагу, как описано выше.
- Затем в каждую лунку вносят 100 мкл хромогенного раствора ТМБ (тетраметилбензидин). Инкубируют 30 мин при комнатной температуре, в темноте. По окончании инкубации вносят в каждую лунку 100 мкл Стоп-реагента.
- Результаты анализа учитывают спектрофотометрически при длине волны 450 нм. Оптическую плотность определяли на микропланшетном спектрофотометре. По результатам, полученным для стандартов, строится калибровочная кривая и по ней определяется содержание тестируемого вещества в исследуемых образцах.

3. Полимеразная цепная реакция с детекцией в режиме реального времени

- Для определения экспрессии исследуемых генов в лейкоцитах крови здоровых доноров проводится выделение РНК из лейкоцитов, далее ставится реакция обратной транскрипции (для синтеза матрицы ДНК на иРНК) и непосредственно полимеразная цепная реакция в режиме реального времени.

Выделение РНК из лейкоцитов периферической крови

Из лейкоцитов крови выделяют общую РНК методом аффинной сорбции на частицах силикагеля, используя коммерческие наборы для выделения РНК строго в соответствии с протоколом.

Примерный протокол выделения РНК:

- лизирующий раствор прогреть до полного растворения кристаллов при 65°C на термостате и внести в промаркированные пробирки по 450 мкл лизирующего буфера и 100 мкл образца. Содержимое пробирки перемешать на вортексе, центрифугировать 5 сек при 5000 об/мин на микроцентрифуге. По 25 мкл ресуспендированного сорбента добавить в каждую пробирку, перемешать и осадить на микроцентрифуге в течение 30 сек при 10 тыс.об/мин. После этого надосадочную жидкость удалить.
- В пробирки добавить по 400 мкл раствора для отмывки 1, перемешать до полного растворения сорбента, центрифугировать при 10 тыс.об/мин 30 сек и удалить надосадочную жидкость. Добавить в пробирки по 500 мкл раствора для отмывки 3, перемешать до полного ресуспендирования сорбента, центрифугировать при 10 тыс.об/мин 30 сек и удалить надосадочную жидкость. Данную отмывку производить дважды.
- По 400 мкл раствора 4 добавить в пробирки, перемешать до полного растворения сорбента, центрифугировать при 10 тыс.об/мин 30 сек и удалить надосадочную жидкость. Далее осадившийся в пробирках сорбент подсушить в термостате при 60°C 15 минут, крышки пробирок должны быть открыты. Добавить в пробирки по 50 мкл РНК-буфера, перемешать и поместить в термостат на 2-3 мин при 60°C. Перемешать и центрифугировать пробирки на максимальных оборотах в течение 1 мин.

- Полученная надосадочная жидкость содержит очищенную РНК клеток, которую необходимо аккуратно отобрать из пробирок, не захватывая сорбент, и хранить при температуре минус 70°C.
Далее на полученных образцах РНК проводится реакция обратной транскрипции (ОТ) для получения кДНК с использованием фермента ревертазы.
Получение кДНК с помощью реакции обратной транскрипции
- Реакцию обратной транскрипции проводят с использованием коммерческих наборов для синтеза первой цепи ДНК на матрице РНК интересующего гена для последующего определения числа копий с помощью ПЦР в реальном времени.
Примерный протокол реакции ОТ:
- Постановка реакции ОТ проводится в два последовательных этапа с приготовлением смеси №1 и смеси №2. В отдельном эппендорфе (0,6 мл) готовили смесь №1: 1 мкл Random-праймера [15 ОЕ/мл] (шестичленные олигонуклеотиды со случайной последовательностью), 1 мкл праймера Oligo(dT) [15 ОЕ/мл] и 8 мкл ddH₂O (Табл. 1). Приготовленную смесь №1 раскапывали по пробиркам по 10 мкл на одну пробу.
- Добавляли 10 мкл РНК, а в пробирку с отрицательным контролем вносили 5 мкл ddH₂O, перемешивали с помощью вортекса (Микроспин FV-2400, BioSan) и помещали в термостат «Термит» («ДНК-технология», РФ), Инкубировали 3 мин при температуре 75°C для проведения отжига праймеров. В отдельном эппендорфе готовили смесь №2 (в соответствии с фирменным протоколом).
- Пробирки после инкубации охлаждают до 4°C и при 4°C в них вносят по 15 мкл смеси №2, инкубируют в термостате следующем температурно-временном режиме: 37°C 40 мин, 95°C 10 мин. Полученную после проведения реакции ОТ кДНК хранят при температуре минус 70°C для дальнейшего проведения ПЦР-РВ.
Определение уровня экспрессии исследуемых генов методом ПЦР в режиме реального времени
- ПЦР проводят с применением коммерческих наборов и праймеров.
- Для каждой системы для определения экспрессии исследуемых генов выделялись опытные пробирки, отрицательный контроль ОТ и отрицательный контроль ПЦР. Объемы реактивов для проведения ПЦР-РВ представлены в таблице 1.
- Реакционную смесь готовят из коммерческих реактивов и разносят в пробирки по 12 мкл, и добавляли по 3 мкл проб кДНК, полученных с помощью реакции ОТ. В качестве контроля использовали две пробы: реакционная смесь + dd H₂O (К-) и реакционная смесь + отрицательный контроль реакции ОТ (ОТК-).
- Реакцию ПЦР-РВ проводили на ПЦР-амплификаторе (Rotor-GeneQ, Qiagen, США). После проведения ПЦР-РВ получают зависимости интенсивности флуоресценции от количества циклов амплификации. По этим данным рассчитывают скорость нарастания флуоресценции и по калибровочной кривой определяли количество кДНК в образцах. Полученные данные после ПЦР-амплификации по каждому из исследуемых генов пересчитываются по калибровочной кривой относительно гена *β-актина*.
- Для определения специфичности ПЦР-продукта, после реакции амплификации проводят процедуры плавления. В режиме плавления происходит повышение температуры в заданных границах с определенным шагом (с выдержкой времени после каждого шага) и измерение интенсивности флуоресценции при каждой температуре
- При увеличении температуры ДНК денатурирует, в результате чего краситель SYBR Green I переходит в раствор и перестает флуоресцировать. При достижении температуры плавления специфического ПЦР-продукта происходит резкое падение интенсивности флуоресценции, так как сразу денатурирует большое количество ДНК и

SYBR Green I массивно выходит в раствор. На графике производной изменения интенсивности флуоресценции это выражается в виде пика.

4. Выделение и культивирование МНК периферической крови человека

Суспензию мононуклеарных клеток выделяют из периферической крови человека по методу, основанному на седиментации в одноступенчатом градиенте плотности фиколл-урографина.

- Выделение МНК проводят в стерильных условиях при комнатной температуре. 15 мл гепаринизированной крови человека (25 ед. гепарина на 1 мл крови) разводят в 3 раза (1 часть крови и 2 части среды RPMI1640), тщательно перемешивали и наслаивали на раствор фиколл-урографина (плотность 1,077 г/см³), затем центрифугировали 45 минут при 400 G (1700 об/мин) в центрифуге с горизонтальным ротором.
- После центрифугирования собирают интерфазное кольцо, содержащее МНК. Суспензию МНК трижды отмывают средой RPMI1640, центрифугируя по 10 минут при 200 G, после чего клетки ресуспендируют в 1 мл среды RPMI 1640, содержащей антибиотик – гентамицин (100 мкг/мл). Количество выделенных МНК подсчитывают в камере Горяева по стандартно методике или в автоматическом счетчике клеток. Жизнеспособность клеток оценивают с помощью 0,1% раствора трипанового синего.
- МНК, выделенные из периферической крови, культивируют в полной среде RPMI 1640, содержащей антибиотик (гентамицин) и 10% ЭТС, в течение 24 и/или 48 часов при 37°C. Рабочая концентрация клеток составляла $1 \cdot 10^6$ в мл. В качестве стимуляторов к клеткам могут быть добавлены агонисты различных рецепторов и/или препараты.
- Контролем служат МНК, культивируемые в чистой среде RPMI 1640. По окончании культивирования МНК осаждают центрифугированием при 400 G в течение 15 минут. Супернатанты собирают и хранят для дальнейшего исследования другими методами (напр. ИФА).

5. Секвенирование.

Метод секвенирования используется для прямого определения последовательности нуклеотидов в исследуемом фрагменте ДНК. Одной из разновидностей методики секвенирования является пиросеквенирование.

Методика пиросеквенирования проводится по следующей схеме.

- Исследуемый фрагмент ДНК амплифицируют с помощью ПЦР.
- Для иммобилизации ПЦР-фрагментов используют частицы сефарозы, покрытые стрептавидином — Streptavidin sepharose High Performance». Смесь для иммобилизации содержит 2 мкл частиц сефарозы, 40 мкл связывающего буфера, 28 мкл стерильной воды.
- Далее в планшет вносят 10 мкл ПЦР продукта и 70 мкл полученной смеси.
- Инкубируют планшет в шейкере в течении 10 минут при 1400 об/мин.
- После серии отмывок с использованием станции для пробоподготовки PyroMark Q24 Vacuum Workstation» (Qiagen, Германия) полученную оцДНК отжигают с 12 мкл праймера, связанного с биотином, при 80С в течении 2 мин в планшете для секвенирования.
- Для проведения реакции пиросеквенирующего синтеза используется набор реагентов PyroMark Gold Reagents Q96 (Qiagen, Германия), который включала в себя смесь ферментов, субстратов и каждого из нуклеотидов. Расчет необходимого

количества реагентов для анализа рассчитывался с помощью программного обеспечения пиросеквенатора РугоMarkQ24» (Qiagen, Германия).

6. Проточная цитометрия

Проточная цитометрия используется для оценки поверхностной экспрессии клеточных маркеров и рецепторов, а также для исследования фенотипа лейкоцитов периферической крови человека.

Примерный протокол исследования по оценке экспрессии TLR2 и TLR4 на лейкоцитах периферической крови человека:

- Суспензию лейкоцитов периферической крови инкубируют с 0,5% БСА в течение 30 минут при 4°C для исключения неспецифического связывания с МАТ.
- Встряхивают осадок на вортексе, чистыми наконечниками добавляют в каждую пробирку по 5 мкл моноклональных антител к CD14, меченых APC («e-Biosciences») и 10 мкл моноклональных антител к CD45, меченых ECD («e-Biosciences»). В первую пробирку добавляли 5 мкл моноклональных антител Mouse IgG2a, меченых AlexaFluor 488 («e-Biosciences»), во вторую - 5 мкл моноклональных антител к CD282 (TLR2), меченых AlexaFluor 488 («e-Biosciences»); в третью - 5 мкл моноклональных антител к CD 284 (TLR4), меченых AlexaFluor 488 («e-Biosciences»).
- Клетки с антителами инкубируют согласно инструкции в течение 10 минут в темноте при комнатной температуре.
- Вносят лизирующий раствор IOtest 3 Lysing Solution (Beckman Coulter, США) в рекомендованном производителем объеме. Перемешивают на вортексе.
- Клетки с лизирующим раствором инкубируют в течение 10 минут при комнатной температуре.
- Дважды отмывают клетки от несвязавшихся антител в мкл раствора Хенкса (ПанЭко, РФ) путем центрифугирования при 1000 об/мин в течение 5 минут. Встряхивают осадок на вортексе.
- Анализ образцов на проточном цитометре «Navios» (Beckman Coulter, Inc.) проводят сразу после окончания этапа пробоподготовки.
- В каждом образце анализируется не менее 100000 событий. Лейкоцитарный гейт выделяют по экспрессии CD45. Оценивают процент CD14+ моноцитов, лимфоцитов и гранулоцитов, экспрессирующих TLR2 или TLR4, а также среднюю интенсивность экспрессии (СИФ) этих рецепторов на лейкоцитах здоровых доноров. Среднюю интенсивность флуоресценции рассчитывают как отношение интенсивности флуоресценции образца на интенсивность флуоресценции изотипического контроля.