

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ  
Первый заместитель Министра  
Е.Л. Богдан  
«11» 06 2021 г.  
Регистрационный № 050-06д1

**АЛГОРИТМ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АРТЕРИОЛОТРОМБОЗА И  
МЕТОД ВТОРИЧНОЙ МЕДИЦИНСКОЙ ПРОФИЛАКТИКИ  
ЛАКУНАРНОГО ИНФАРКТА МОЗГА ПРИ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ  
МИКРОАНГИОПАТИИ**

(инструкция по применению)

**УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ:** государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр неврологии и нейрохирургии»; государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий»

**АВТОРЫ:** к.м.н. Анацкая Л.Н.; Гончарова Н.В.; д.м.н., профессор Потапнев М.П.; к.б.н. Матусевич Л.И.; Марченко С.В.; Свиридович С.Я.

Минск, 2021

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкции) изложен алгоритм определения артериолотромбоза и метод вторичной медицинской профилактики лакунарного инфаркта мозга (ЛИМ) при церебральной микроангиопатии (ЦМА), которые могут быть использованы в комплексе медицинских услуг, направленных на вторичную медицинскую профилактику ЛИМ.

Метод, изложенный в настоящей инструкции, предназначен для врачей-неврологов, врачей лабораторной диагностики и иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с ЛИМ при ЦМА в стационарных и (или) амбулаторных условиях.

### **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

- ВВ – внеклеточные везикулы.
- ЛИМ – лакунарный инфаркт мозга.
- МКА – моноклональные антитела.
- МПК – мононуклеары периферической крови.
- РКТ – рентгеновская компьютерная томография.
- МРТ – магнитно-резонансная томография.
- ТМЧ – тромбоцитарные микрочастицы.
- ФДЭ-3 – фосфодиэстераза 3 типа.
- ФСБ – фосфатно-солевой буферный раствор.
- ХБП – хроническая болезнь почек.
- ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких.
- ЦМА – церебральная микроангиопатия.
- ЭМЧ – эндотелиальные микрочастицы.
- CD – кластер дифференцировки.
- FL – флуоресцентный канал (fluorescent canal).
- FSC – прямое светорассеяние (forward scatter).
- SSC – боковое светорассеяние (side scatter).

## **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Лакунарный инфаркт мозга (МКБ 10 – I63.9), верифицированный с помощью методов нейровизуализации РКТ и/ или МРТ.

## **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ**

Соответствуют таковым для медицинских изделий и лекарственных средств, необходимых для реализации данной инструкции.

## **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ, УСЛОВИЙ, ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАГЕНТОВ И РАСХОДНЫХ МАТЕРИАЛОВ, ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ**

1. Аппарат для выполнения компьютерной и/или магнитно-резонансной томографии головного мозга.

2. Ультразвуковой диагностический аппарат, работающий в В-режиме, цветовом, импульсно-волновом доплеровском режимах, оснащенный линейным датчиком с частотой сканирования 7,5-10,0 МГц и секторным (векторным) датчиком с частотой сканирования 1,5-2,5 МГц, аппарат для ультразвуковой доплерографии с датчиками 2 и 4 МГц.

3. Автоматический анализатор системы гемостаза.

4. Коагулометр.

5. Тромбоагрегометр.

6. Проточный лазерный цитофлуориметр.

### **Вспомогательные устройства**

1. Дозаторы переменного объема с диапазоном 0,1-1000 мкл.

2. Миницентрифуга типа «вортекс».

3. Центрифуга, оснащенная бакет-ротатором или аналог.

4. Ультрацентрифуга рефрижераторная.

### **Реагенты и расходные материалы:**

1. Пробирки, совместимые с проточным цитофлуориметром.

2. Пробирки пластиковые стерильные центрифужные объемом 15 мл.
3. Пробирки типа «эппендорф» объемом 1,5 мл.
4. Стерильные фильтры с диаметром пор 0,2 мкм.
5. Наконечники для дозаторов переменного объема.
6. Рабочие растворы для обеспечения работы проточного цитофлуориметра.
7. Стандартные частицы для настройки корректной работы проточного цитофлуориметра в соответствии с рекомендациями производителя.
8. Лизирующий раствор: 0,17 М хлорид аммония, 9,4 мМ гидрокарбонат калия, 0,09 мМ К<sub>3</sub>ЭДТА и 15 мМ азид натрия (рН 7,2±0,1).
9. Инкубационный раствор: 0,01 М фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБ), содержащий 0,15 М хлористого натрия и 15 мМ азид натрия (рН 7,2±0,1).
10. Отмывочный раствор: 0,01 М ФСБ, содержащий 0,15 М хлористого натрия и 15 мМ азид натрия (рН 7,2±0,1).
11. 0,01 М ФСБ, содержащий 0,1% бычий сывороточный альбумин (БСА).
12. Фиксирующий раствор: 1% раствор параформальдегида на ФСБ (рН 7,2±0,1).
13. Деионизированная вода.
14. Изотипические контроли, соответствующие изотипу применяемых моноклональных антител (МКА).
15. Антиген-специфичные МКА, меченные флуорохромами, к антигенам клеток человека Annexin V, CD31, CD41, CD61, CD62P, CD45, CD309, CD144, CD146 и CD235a.

Допускается использование аналогичного оборудования, материалов и реактивов, по качественным характеристикам, не уступающим указанным выше, разрешенным Министерством здравоохранения для применения на территории Республики Беларусь.

## **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗУЕМОГО МЕТОДА**

### **1. Клинические критерии диагностики церебральной микроангиопатии:**

– наличие сосудистых факторов риска развития микроангиопатии: артериальной гипертензии, сахарного диабета, гиперхолестеринемия, хронической болезни почек (ХБП), хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ);

– отсутствие кардиоэмболических факторов риска инфаркта мозга: фибрилляции предсердий, постинфарктного кардиосклероза, стеноза аортального и митрального клапанов сердца, искусственных клапанов сердца;

– отсутствие стенозирования магистральных артерий головы > 30% по данным сонографии.

– при исследовании сосудов глазного дна наличие косвенных признаков ЦМА в виде ретинальной ангиопатии;

– при нейровизуализации на РКТ или МРТ головного мозга наличие косвенных признаков ЦМА: очагов лейкоареоза в белом веществе полушарий головного мозга, подкорковых ганглиях; единичных и множественных лакун в подкорковых ганглиях, белом веществе головного мозга; расширение периваскулярных пространств.

### **2. Алгоритм определение артериолотромбоза у пациентов в остром периоде лакунарного инфаркта мозга при церебральной микроангиопатии.**

#### **2.1. Количественное определение концентрации фибриногена в плазме крови.**

Исследование содержания в плазме крови концентрации фибриногена определяется на коагулометре.

## **2.2. Определение уровня фактора фон Виллебранда.**

Исследование содержания концентрации в плазме крови антигена фактора Виллебранда проводится методом иммунотурбидиметрии на коагулометре.

## **2.3. Определение уровней и иммунологического фенотипа циркулирующих в периферической крови тромбоцитарных и эндотелиальных микрочастиц методом проточной цитометрии.**

### **2.3.1 Подготовка биологического материала и реагентов.**

– Образцы периферической крови забираются из кубитальной вены иглой большого диаметра с помощью вакуумной системы для забора проб венозной крови с 3,8% цитратом натрия (0,129М) в качестве антикоагулянта в утренние часы натощак и доставляются в лабораторию в специальном контейнере в течение 1 часа для дальнейших исследований.

– Используемый свободный от белков фосфатно-солевой раствор фильтруется через фильтр с размером пор 0,2 мкм, рН 7,2.

– Вносимые в исследуемые образцы МКА центрифугируются 3-5 мин 1000 об/мин (+18<sup>0</sup>С).

– Используемые в работе растворы должны подвергаться обязательной фильтрации через фильтр с размером пор 0,2 мкм. Проточные жидкости проходят очистку через систему фильтрации цитометра.

### **2.3.2. Изоляция внеклеточных везикул.**

Изоляция везикул осуществляется индивидуальным методом путем дифференциального центрифугирования.

– Цельная кровь центрифугируется 15 мин при 1500g при (+18<sup>0</sup>С);

– Для осаждения микровезикул отбирается обедненная клеточным материалом плазма и центрифугируется 60 мин при 13000g (+4<sup>0</sup>С).

– Изолированные микровезикулы дважды отмываются ФСБ в течение 30 мин при 13000g и ресуспендируются в 1000 мкл ФСБ.

### 2.3.3. Пробоподготовка внеклеточных везикул.

– В маркированные пробирки вносится 100 мкл взвеси внеклеточных везикул для дальнейшей маркировки МКА к фосфатидилсерину, CD31, CD41, CD61, CD62P, CD45, CD309, CD144, CD146 и CD235a человека, меченными FITC, PE, PE-CY5.5, PE-CY7, APC и APC-CY7 в необходимой концентрации. Титры антител устанавливаются опытным путем.

– В качестве контрольных образцов используются деионизированная вода (или вода для инъекций), ФСБ, ФСБ с 0,1% бычьим сывороточным альбумином (БСА) и неокрашенные внеклеточные везикулы.

– Образцы инкубируются 40 мин в темноте при комнатной температуре. Перед началом анализа образцы микровезикул разводятся ФСБ в соотношении 1:1000.

### 2.3.4. Параметры и настройка проточного цитофлуориметра.

Аналитическую цитометрию проводят на лазерном проточном цитофлуориметре с использованием соответствующего программного обеспечения.

#### 2.3.4.1. Параметры проточного цитофлуориметра.

Проточный цитофлуориметр предназначен для учета и многопараметрического анализа отдельных частиц в жидкой системе.

Параметры:

- чувствительность SSC – не более 0,5 мкм;
- чувствительность FSC – не более 1 мкм;
- пороговая чувствительность флуоресценции FITC <100 молекул;
- пороговая чувствительность флуоресценции PE <50 молекул;
- коэффициент вариации при окрашивании пропидий йодидом ядер эритроцитов курицы <3,0% G0/G1;

2.3.4.2. Проточный цитофлуориметр калибруется в соответствии с инструкцией изготовителя с обязательным применением нагруженных флуорохромом микробус и дополнительных контролей степени чистоты проточных линий и используемых буферных растворов с помощью

программы рабочей настройки оборудования. Для возбуждения флуоресценции используется монохроматический луч лазера. В этом же луче измеряются переднее (forward scattering – FSC, чувствительность FSC не более 1 мкм) и боковое (side scattering – SSC, чувствительность SSC не более 0,5 мкм) светорассеивание анализируемых частиц.

2.3.4.3. Для проведения анализа цитофлуориметр настраивается в зависимости от типа анализируемых частиц и вида анализа.

2.3.4.4. Для обеспечения возможности подсчета частиц скорость потока во время анализа маркеров поверхности частиц настраивается таким образом, чтобы быть стабильной. Поток взвеси частиц фокусируется до единичных событий в проточной ячейке. Для детекции флуоресценции используется комбинация оптических фильтров и зеркал. Подбор фильтров осуществляется исходя из спектра возбуждения и эмиссии флуорохрома. Для оптимальной визуализации и увеличения разрешения между популяциями частиц с различными характеристиками импульсы напряжения должны быть логарифмически усилены.

2.3.5. Накопление данных и мультипараметрический анализ внеклеточных везикул.

– Регистрация данных и расчет процентного содержания маркированных частиц производятся с использованием программного обеспечения проточного цитофлуориметра.

– Популяции частиц оцениваются с использованием логического «гейтирования» в Dot Plot по их линейному (FSC) и боковому (SSC) светорассеиванию, по времени пролета частиц с учетом спектральных характеристик рабочих флуорохромов, анигенам линейной принадлежности и экспрессии фосфатидилсерина. Степень чистоты популяции клеток не менее 95%. В каждой пробе анализируется не менее 500 000 частиц.

– Мультипараметрический анализ производится с учетом размера и экспрессии антигенов интереса. Разрабатывается стандартный протокол,

включающий морфологические и флуоресцентные характеристики анализируемых образцов.

– Для расчета процентного содержания маркированных клеток и плотности экспрессии антигенов, характеризующих изучаемую популяцию, используется статистический пакет программного обеспечения цитофлуориметра или аналог.

#### **2.4. Оценка параметров гемостаза.**

Увеличение концентрации фибриногена в плазме крови свыше 3,7 г/л.

Увеличение уровня концентрации антигена фактора фон Виллебранда в плазме крови свыше 203%.

#### **2.4.3. Оценка результатов анализа тромбоцитарных микрочастиц с прокоагулянтным потенциалом.**

Оценка уровня ТМЧ с прокоагулянтным потенциалом, влияющих на эффективность проводимой антиагрегантной терапии, производится на базе определения относительных/ абсолютных уровней тромбоцитарных микровезикул с прокоагулянтным фенотипом CD41<sup>+</sup>CD61<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>CD62P<sup>+</sup>. Дополнительно оценивается степень связывания поверхностного фосфатидилсерина с Annexin V для характеристики функциональной и прокоагулянтной активности микровезикул.

Отклонения уровней ТМЧ на 15% от уровней контрольных значений, установленных в группе здоровых лиц, считаются значимыми и свидетельствуют об имеющихся нарушениях в системе гемостаза

#### **2.4.3. Оценка результатов анализа эндотелиальных микрочастиц с прокоагулянтным потенциалом.**

Оценка степени деструкции сосудистого эндотелия и эффективности проводимой антиагрегантной терапии производится на базе определения относительных/ абсолютных уровней эндотелиальных микровезикул с фенотипом CD31<sup>+</sup>CD309<sup>+</sup>CD144<sup>+</sup>CD146<sup>+</sup>. Дополнительно оценивается степень связывания поверхностного фосфатидилсерина с Annexin V для

характеристики функциональной и прокоагулянтной активности микровезикул.

Отклонения уровней ЭМЧ на 15% от уровней контрольных значений, установленных в группе здоровых лиц, считаются значимыми и свидетельствуют о нарушении эндотелиального гомеостаза.

Для исключения ложноположительных результатов из анализа исключаются микровезикулы, экспрессирующие CD45 и CD235a, а также иные нецелевые объекты.

### **ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ И ОСЛОЖНЕНИЯ**

Доставка образцов периферической крови не должна превышать 2 часа.

Учет и анализ внеклеточных везикул требуют корректной настройки проточного цитометра, включая настройку дискриминатора, чувствительности каналов светорассеивания и флуоресценции; введение коэффициентов компенсации, согласно алгоритма подготовки рабочих протоколов для анализа частиц, расчета компенсационной матрицы, скорости потока, а также протокола учета и анализа частиц.

Для работ по идентификации внеклеточных везикул периферической крови необходимо использовать прошедшие фильтрацию (размер пор 0,2 мкм) ФСБ без содержания белковых компонентов и проточные жидкости. Растворы используемых в работе МКА необходимо центрифугировать для изоляции белковых агрегатов.

Система контролей включает калибровочные частицы с заранее известными параметрами, деионизированную воду, ФСБ, а также в качестве контроля аутофлуоресценции и неспецифического связывания рекомендуется использовать немаркированные изоляты микровезикул и изотипические контроли.

Анализируемая взвесь может содержать различные виды микровезикул, которые нежелательны либо не являются целью анализа. Для исключения нецелевых объектов необходимо использовать «якорные» антигены.

### **3. Вторичная медицинская профилактика лакунарного инфаркта мозга при церебральной микроангиопатии.**

3.1. Пациенты в остром периоде ЛИМ при ЦМА получают лечение согласно клиническому протоколу «Диагностика и лечение пациентов с заболеваниями нервной системы (взрослое население)», утвержденному Постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь №8 от 18.01.2018 г. с применением антитромботических гиполипидемических, антигипертензивных лекарственных средств.

3.2. Дополнительный комплекс медицинских услуг, направленных на вторичную медицинскую профилактику ЛИМ при ЦМА, включает применение двойной антиагреганой терапии АСК с целью более эффективного снижения прокоагулянтной активности тромбоцитов и ТМЧ, ЭМЧ, уменьшения выраженности эндотелиальной дисфункции.

При увеличении в первые 48 ч заболевания концентрации фибриногена свыше 3,7 г/л, уровня антигена фактора фон Виллебранда свыше 203%, уровня ТМЧ с прокоагулянтным фенотипом CD41<sup>+</sup>CD61<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>CD62P<sup>+</sup> на 15%, уровня ЭМЧ с прокоагулянтным фенотипом CD31<sup>+</sup>CD309<sup>+</sup>CD144<sup>+</sup>CD146<sup>+</sup> на 15% дополнительно в качестве повышения эффективности антиагрегантной терапии согласно п. 3.1. настоящей Инструкции к АСК 75 мг 1 раз в день назначается ингибитор фосфодиэстеразы 3 типа (ФДЭ-3) 100 мг 2 раза в день в течение двух недель (приложение 1).

#### **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Противопоказания, соответствующие противопоказаниям к применению АСК и ингибитору ФДЭ-3.

#### **ВОЗМОЖНЫЕ ОСЛОЖНЕНИЯ**

Осложнения, соответствующие, указанным для АСК и ингибитору ФДЭ-3.

# Приложение 1

## АЛГОРИТМ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АРТЕРИОЛОТРОМБОЗА И ВТОРИЧНОЙ МЕДИЦИНСКОЙ ПРОФИЛАКТИКИ В ОСТРОМ ПЕРИОДЕ ЛАКУНАРНЫХ ИНФАРКТОВ МОЗГА ПРИ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ МИКРОАНГИОПАТИИ

