

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ
БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ



Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневиц

10 июля 2018 г.

Регистрационный № 221-1218

**МЕТОД ПРОГНОЗИРОВАНИЯ РАЗВИТИЯ ГОРМОНАЛЬНОЙ
РЕЗИСТЕНТНОСТИ У ПАЦИЕНТОВ С НЕФРОТИЧЕСКИМ
СИНДРОМОМ НА ОСНОВЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
БИМОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ**

инструкция по применению

Учреждения-разработчики:

УО «Белорусский государственный медицинский университет»,

УЗ «Городское клиническое патологоанатомическое бюро»

УЗ «2-ая Городская детская клиническая больница» г. Минска

Авторы:

к.м.н. Летковская Т.А.,

к.м.н. Савош В.В.

д.м.н. Черствый Е.Д.

Дмитриева М.В.

Тур Н.И.

Минск, 2018

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Д. Л. Пиневиц

28.12.2018

Регистрационный № 221-1218

**МЕТОД ПРОГНОЗИРОВАНИЯ РАЗВИТИЯ ГОРМОНАЛЬНОЙ
РЕЗИСТЕНТНОСТИ У ПАЦИЕНТОВ С НЕФРОТИЧЕСКИМ
СИНДРОМОМ НА ОСНОВЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОМОЛЕКУЛЯРНЫХ
МАРКЕРОВ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: УО «Белорусский государственный
медицинский университет», УЗ «Городское клиническое патологоанатомическое
бюро», УЗ «2-я городская детская клиническая больница» г. Минск

АВТОРЫ: канд. мед. наук Т. А. Летковская, канд. мед. наук В. В. Савош, д-р мед.
наук Е. Д. Черствый, М. В. Дмитриева, Н. И. Тур

Минск 2018

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод прогнозирования развития гормональной резистентности у пациентов с нефротическим синдромом с использованием иммуногистохимического определения биомолекулярных маркеров. Метод позволит выделить группу лиц с высоким риском развития резистентности к глюкокортикостероидной терапии на этапе первичной диагностики морфологического типа нефропатии.

Инструкция предназначена для врачей-патологоанатомов, врачей-нефрологов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам, страдающим заболеваниями почек.

Область применения: патологическая анатомия, нефрология.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Микроскоп.
2. Микротом.
3. Нагреваемая барокамера Pascal или микроволновая печь.
4. Лабораторная посуда.
5. Холодильник.
6. Вытяжной шкаф.
7. Таймер.
8. Предметные и покровные стекла.
9. Первичные антитела (АТ) к человеческому белку WT1 и CD80.
10. Демакировочный и промывочный буферы.
11. Вторичные НРР-конъюгированные антитела.
12. Диаминобензидин (ДАБ).
13. Заливочная среда.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Гломерулярные болезни (N00-N08).

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Гистологические срезы толщиной 4 мкм депарафинируются, регидратируются, после чего производится блокирование эндогенной пероксидазы путем обработки срезов 3 % раствором перекиси водорода в течение 20 мин. Затем срезы обрабатываются в нагреваемой барокамере Pascal в цитратном буфере (рН 6,0) при температуре 125 °С и давлении 25 psi в течение 2,5 мин. Вместо барокамеры может использоваться микроволновая печь при мощности 700–800 W, однако в этом случае время обработки существенно увеличивается (16 мин), а качество препарата ухудшается. Неспецифическое связывание блокируется 1 % бычьим сывороточным альбумином в трис-буфере (рН 7,6) 30 мин, после чего наносятся первичные антитела в рекомендованных

производителем разведениях. Инкубация с первичным антителом производится в течение 18 ч в холодильнике (4 °С).

После интенсивного промывания в трис-буфере осуществляется визуализация результата реакции при помощи полимерной системы и ДАБ в соответствии с рекомендациями производителя. Длительность инкубации в ДАБ устанавливается в каждой лаборатории индивидуально, для чего необходимо наблюдать процесс появления коричневого окрашивания под микроскопом. Время окрашивания считается достаточным, если структуры, подлежащие окрашиванию, приобрели ярко-золотисто-коричневый цвет, в то время как фоновое окрашивание отсутствует. Срезы контрокрашиваются гематоксилином Майера (время зависит от качества и степени зрелости гематоксилина и устанавливается в каждой лаборатории индивидуально) и заключаются в «канадский бальзам» или аналогичную среду.

Обязательные требования при выборе первичного антитела: указание в спецификации производителя на возможность использования в диагностических целях (маркировка «for in vitro diagnostic use») на формалин-фиксированном материале (маркировка «for formalin-fixed tissues»).

Экспрессия белка WT1 отмечается в подоцитах, а также в некоторых клетках париетального листка капсулы клубочков. В качестве позитивного контроля можно использовать ткань яичка, где маркер экспрессируется в сперматогенном эпителии. Окрашивание характеризуется ядерным паттерном, поскольку WT1 является регулятором транскрипции и находится в ядре клетки.

Экспрессия СВ80 отмечается в виде мембранного окрашивания отдельных подоцитов клубочков и эпителиальных клеток проксимальных почечных канальцев. Кроме того, могут выявляться позитивно окрашенные клетки инфильтрата в строме почки.

МОРФОМЕТРИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ЭКСПРЕССИИ БИОМОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ

1. Для морфометрического анализа экспрессии WT-1 необходимо при помощи микроскопа с цифровой камерой сфотографировать пять случайно выбранных клубочков биоптата (увеличение 400). В случаях фокального сегментарного гломерулярного склероза (ФСГС) выбирают клубочки без сегментарных склеротических изменений во избежание заниженной оценки экспрессии. Морфометрическая оценка компонентов клубочков может быть выполнена с помощью программ анализа изображения (например, WCIF ImageJ).

Экспрессию белка WT1 используют для идентификации подоцитов. Необходимо определить количество подоцитов (WT1-позитивные ядра) в каждом из клубочков. Это можно сделать вручную или с помощью модуля «Cell counter» программы WCIF ImageJ. На основании полученных данных рассчитывают:

Число подоцитов на один клубочек = число WT1-позитивных ядер/число клубочков.

2. Экспрессия CD80 в клубочках и канальцевом эпителии определяется полуколичественно по следующим критериям:

«0» — отсутствие экспрессии в капиллярах клубочка и капсуле Шумлянско-Боумена, единичные позитивные эпителиоциты в проксимальных канальцах;

«1+» — слабовыраженная экспрессия, единичные позитивно окрашенные клетки в капиллярном тельце и капсуле Шумлянско-Боумена клубочка, позитивно окрашено более 30 % эпителиальных клеток в проксимальных канальцах;

«2++» — умеренно выраженная экспрессия, позитивно окрашено от 20 до 50 % всех клеток в капиллярном тельце и капсуле Шумлянско-Боумена клубочков почки, позитивно окрашено более 50 % эпителиальных клеток в проксимальных канальцах;

«3+++» — выраженная экспрессия, в клубочках и канальцах почки позитивно окрашено большинство клеток (подоцитов и эпителиоцитов).

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ МОРФОМЕТРИЧЕСКОЙ ОЦЕНКА ЭКСПРЕССИИ БИОМОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ

1. Для оценки вероятности развития резистентности к глюкокортикостероидным препаратам у конкретного пациента с нефротическим синдромом следует определить среднее количество подоцитов в клубочке: уменьшение количества подоцитов ниже 19,3 клетки на один клубочек.

2. Умеренно выраженная и выраженная (2++ и 3+++) экспрессия CD80 в подоцитах и эпителиальных клетках канальцев почки позволяет с высокой вероятностью говорить о наличии у пациента стероид-чувствительного нефротического синдрома.

Способ позволяет с высокой достоверностью прогнозировать прогрессирующее течение стероид-резистентного нефротического синдрома при гломерулонефрите у детей на основании раннего выявления клинических и морфологических предикторов.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Осложнений при применении данного метода не зарегистрировано. Ошибки в применении метода могут быть обусловлены:

неправильным забором и фиксацией патоморфологического материала;
использованием просроченных или неправильно хранившихся реагентов;
неправильным разведением реактивов, несоблюдением временного и температурного режима при выполнении методики.

Во избежание ошибочных результатов необходимо строго соблюдать все методические требования при биопсии и гистологическом, иммуногистохимическом исследовании.