

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

\_\_\_\_\_ В.А. Ходжаев

11.02.2011 г.

Регистрационный № 258-1210

**МЕТОД ПРОГНОЗИРОВАНИЯ НЕБЛАГОПРИЯТНОГО ТЕЧЕНИЯ  
ПЕРВИЧНЫХ ГЛОМЕРУЛОПАТИЙ У ДЕТЕЙ  
НА ОСНОВЕ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОГО ВЫЯВЛЕНИЯ  
БИОМОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ ФИБРОГЕНЕЗА**

инструкция по применению

**УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ:**

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

**АВТОРЫ:**

канд. мед. наук Савош В.В.,  
канд. мед. наук, доц. Летковская Т.А.,  
д-р мед. наук, проф. Черствый Е.Д.,  
Тур Н.И.,  
канд. мед. наук Крылова-Олефиренко А.В.,  
канд. мед. наук Клецкий С.К.

Минск 2010

Инструкция разработана с целью выявления предикторов неблагоприятного прогноза течения первичных гломерулопатий у детей и содержит рекомендации по иммуногистохимическому (ИГХ) определению биомолекулярных маркеров фиброгенеза в материале пункционных нефробиопсий.

Инструкция предназначена для врачей-патологоанатомов, а также нефрологов.

Области применения: патологическая анатомия, нефрология. Уровень внедрения: патологоанатомические бюро и лаборатории.

Инструкция разработана в рамках задания 3.37 «Изучение молекулярных маркеров прогрессирования гломерулопатий, факторов риска, особенностей диагностики и коррекции диабетических остеопатий для оптимизации их диагностики и лечения» ГКПНИ «Современные клеточные и молекулярно-генетические технологии в медицине; новые подходы к регуляции, коррекции (реабилитации) и профилактике патологических состояний человека» (№ гос. регистрации 20082415).

### **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Прогнозирование неблагоприятного течения первичных гломерулопатий у детей при исследовании материала пункционной биопсии почки.

### **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Противопоказания к применению отсутствуют.

### **Перечень необходимого оборудования**

1. Микроскоп.
2. Цифровая камера.
3. Микротом с возможностью изготовления гистологических срезов толщиной 4 мкм.
4. Нагреваемая барокамера Pascal или микроволновая печь.
5. Лабораторная посуда.
6. Холодильник.
7. Вытяжной шкаф.
8. Таймер.

### **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ РЕАКТИВОВ И РАСХОДНЫХ МАТЕРИАЛОВ:**

1. Антитела к гладкомышечному актину- $\alpha$  (ГМА- $\alpha$ ) и фибронектину.
2. 3%-й раствор перекиси водорода или фирменный блокатор пероксидазы.
3. Трис-буфер pH 7,6.
4. Буфер для демаскировки антигенов pH 6,0.
5. 1%-й раствор БСА.
6. Карандаш для ИГХ.

7. Система визуализации на полимерной основе к мышинным и кроличьим антителам или универсальная (к мышинным и кроличьим антителам).

8. Диаминобензидин (ДАБ).

9. Гематоксилин Майера.

10. Ксилол.

11. 96° спирт.

12. Канадский бальзам.

13. Предметные стекла для ИГХ (или предметные стекла предварительно обработанные поли-L-лизинном или силаном).

14. Покровные стекла.

15. Лабораторные стаканы.

### **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СПОСОБА ИГХ ВЫЯВЛЕНИЯ БИОМОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ ФИБРОГЕНЕЗА В ТКАНИ ПОЧЕК**

Гистологические срезы толщиной 4 мкм депарафинируются, регидратируются, после чего производится блокирование эндогенной пероксидазы путем обработки срезов 3%-м раствором перекиси водорода в течение 20 мин. После этого срезы обрабатываются в нагреваемой барокамере Pascal в цитратном буфере (pH 6.0) при температуре 125 °C и давлении 25 psi в течение 30 с. Вместо барокамеры может использоваться микроволновая печь при мощности 700–800 Вт, однако в этом случае время обработки существенно увеличивается (16 мин), а качество препарата ухудшается. Неспецифическое связывание блокируется 1%-м бычьим сывороточным альбумином в трис-буфере (pH 7,6) 30 мин, после чего наносятся первичные антитела в соответствующих разведениях (табл. 1). Инкубация с первичным антителом производится в течение 18 ч в холодильнике (+4°C).

Таблица 1

Рекомендуемые разведения для первичных антител

Название антитела	Разведение антитела
Анти-ГМА-α	1:400
Анти-фибронектин	1:1000

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. Приведенный метод проверен на антителах производства ДАКО, в случае использования других антител условия окраски могут отличаться. 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»).

Для контроля активности первичных антител в каждой серии необходимо одно отрицательное и одно положительное контрольное окрашивание. В качестве отрицательного контрольного окрашивания срезы вместо инкубации с первичным антителом покрываются 1%-м раствором бычьего сывороточного альбумина. В качестве положительного контроля для антител к ГМА- $\alpha$  может быть использована грануляционная ткань, для антител к фибронектину — ткань миндалина. Окраска расценивается как положительная только при отсутствии окрашивания в отрицательном контрольном препарате и, наоборот, как отрицательная при наличии окрашивания в положительном контрольном препарате.

### **ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ИГХ ОКРАШИВАНИЯ БИМОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ ФИБРОГЕНЕЗА В МАТЕРИАЛЕ НЕФРОБИОПСИЙ**

Результат ИГХ выявления антигена ГМА- $\alpha$  представлен в виде гомогенного окрашивания цитоплазмы интерстициальных миофибробластов, гладкомышечных клеток почечных сосудов и отдельных клеток канальцевого эпителия в коричневый цвет различной интенсивности от светло-золотистого до темно-коричневого оттенка.

Результат ИГХ выявления фибронектина представлен в виде очагового окрашивания внеклеточного матрикса мезангиума клубочков, межканальцевой, периваскулярной и перигломерулярной стромы в коричневый цвет различной интенсивности от светло-золотистого до темно-коричневого оттенка.

Оценка выраженности экспрессии вышеуказанных биомолекулярных маркеров может быть количественной (с использованием программы для морфометрии Aperio Image Scope) или полуколичественной.

Количественная оценка экспрессии ГМА- $\alpha$  и фибронектина выполняется путем анализа цифрового изображения, полученного с помощью микроскопа и фотокамеры (рекомендуемое увеличение — 400, минимальное количество полей зрения — 5), с использованием алгоритма «positive pixel count» программы для морфометрии Aperio Image Scope. Результатом проведенного анализа являются данные о распространенности и интенсивности коричневой окраски продуктов реакции ДАБ (красные поля — выраженная экспрессия, оранжевые — умеренно-выраженная, желтые — слабовыраженная, синяя и белая окраска — отсутствие

экспрессии). В дальнейшем рекомендуется рассчитывать показатель экспрессии (ПЭ) обоих маркеров:

=/

$$\text{ПЭ} = \frac{\text{число позитивных пикселей}}{\text{общее число пикселей}}$$

Полуколичественная оценка выраженности экспрессии ГМА- $\alpha$  и фибронектина проводится с помощью светового микроскопа; анализируется распространенность и интенсивность ИГХ окрашивания в препарате.

ГМА- $\alpha$  может считаться при окрашивании единичных клеток в межканальцевой, периваскулярной и/или перигломерулярной строме (2–3 в поле зрения при увеличении 400), отсутствие экспрессии в эпителии почечных канальцев. Окрашивание большего числа интерстициальных миофибробластов в межканальцевой строме (до 10–12 в поле зрения при увеличении 400) и/или выявление групп ГМА- $\alpha$ -позитивных клеток (более 2–3 рядом расположенных клеток) в перигломерулярной и межканальцевой интерстициальной ткани характеризует умеренно-выраженную экспрессию вышеназванного маркера. В случаях с выраженной экспрессией ГМА- $\alpha$  отмечается интенсивное окрашивание клеток и их отростков в межканальцевой, периваскулярной и/или перигломерулярной строме (более 20 в поле зрения при увеличении 400), а также экспрессия ГМА- $\alpha$  в эпителиоцитах отдельных извитых канальцев.

Слабовыраженной экспрессия фибронектина может считаться при выявлении очагового бледно-коричневого окрашивания внеклеточного матрикса межканальцевой стромы. Появление интенсивно окрашенных участков экстрацеллюлярного матрикса между почечными канальцами, а также в перигломерулярной зоне большинства клубочков соответствует умеренно-выраженной экспрессии фибронектина. В случаях с выраженной экспрессией фибронектина отмечается интенсивное коричневое окрашивание участков расширенной межканальцевой стромы, а также внеклеточного матрикса перигломерулярной стромы всех клубочков в препарате.

На основании уровня экспрессии маркеров фиброгенеза (ГМА- $\alpha$  и фибронектина) можно выделить группу пациентов с первичными гломерулопатиями, имеющими высокую вероятность быстрого прогрессирования хронической почечной недостаточности.

Предиктором быстрого развития почечной недостаточности является увеличение показателя экспрессии ГМА- $\alpha$  более 0,016, что соответствует умеренно-выраженной и выраженной степени ИГХ окрашивания. Неблагоприятным прогностическим фактором также следует считать выявление выраженного ИГХ окрашивания с применением антител к фибронектину, что соответствует показателю экспрессии этого маркера более 0,25.

Обнаружение выраженной экспрессии фибронектина и/или умеренно-выраженной и выраженной экспрессии ГМА- $\alpha$  в ткани почек у пациентов с первичными гломерулярными поражениями почек свидетельствует о вероятном неблагоприятном течении заболевания, что определяет

необходимость назначения расширенной схемы нефропротекторной и патогенетической терапии.

### **ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ И ОШИБОК**

Осложнений при применении данного метода не зарегистрировано. Ошибки в осуществлении метода могут обуславливаться:

- неправильной фиксацией патоморфологического материала;
- использованием реактивов с истекшим сроком годности или неправильно хранившихся;
- неправильным разведением реактивов, несоблюдением временного и температурного режима при выполнении методики.

Для избежания подобных ошибок необходимо при иммуногистохимическом исследовании строго соблюдать все методические требования.