

# МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л.Пиневиц

2018 г.

Регистрационный № 100-0918



## МЕТОД ОЦЕНКИ ИММУННОГО СТАТУСА ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ ПОЧЕК ПРИ ОРГАННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека»

АВТОРЫ:

К.м.н. Зыблева С.В., к.м.н., доцент Зыблев С.Л., д.м.н., доцент Рожко А.В.,  
Логинова О.П., Шитикова М.Г., к.м.н., доцент Величко А.В.

Гомель, 2018

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкции) изложен метод оценки иммунного статуса пациентов с хронической болезнью почек при органной трансплантации с использованием лимфоцитарного диагностикума, полученного из лимфатических узлов донора почечного трансплантата. Данный метод может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику иммунологической сенсибилизации к антигенам донора. Предназначена для врачей-специалистов: врачи-трансплантологи, врачи-иммунологи, врачи лабораторной диагностики, врачи-нефрологи, и иные специалисты, оказывающих медицинскую помощь пациентам с хронической болезнью почек в стационарных условиях при трансплантации почки.

#### **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ, ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ, РЕАКТИВОВ И Т.Д.**

1. Набор инструментов для диссекции тканей (пинцет, ножницы);
2. Стерильный контейнер;
3. 0,9%-й раствор хлорида натрия;
4. Бумажный фильтр стерильный с диаметром пор 25 мкм;
5. Раствор PBS;
6. Наборы моноклональных антител;
7. Лизирующий раствор с 3,4% формальдегида;
8. Дистиллированная вода;
9. Пробирки для проточного цитофлюориметра;
10. Пробирки стерильные объемом 10 мл;
11. Стерильная пипетка;
12. Стеклоанный гомогенизатор;
13. Центрифуга лабораторная;
14. Вортекс;

15. Одноканальные дозаторы переменного объема 1-5 мкл, 2-20 мкл, 10-100 мкл, 100-1000 мкл;
16. Наконечники 1-200 мкл, 100-1000 мкл;
17. Лазерный проточный цитофлуориметр;
18. Среда RPMi-1640 с глутамином;
19. Фитогемаглютинин.

### **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Оценка иммунного статуса у пациентов с хронической болезнью почек (N18) при трансплантации почки.

### **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ**

- Отсутствуют.

### **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА**

Этапы проведения исследования:

1. Этап получения лимфоцитарного диагностикума:

1.1. Во время операции трансплантации почки на этапе подготовки трансплантата к пересадке выделяют из донорского материала парааортальные лимфатические узлы и помещают в стерильный контейнер.

1.2. Лимфатические узлы, доставленные в лабораторию, доводят до однородной массы в 5 мл стерильного физиологического раствора стеклянным гомогенизатором с целью максимального сохранения клеточных структур. Для удаления крупнодисперсных частиц, полученный образец пропускают через стерильный бумажный фильтр с диаметром пор 25 мкм.

1.3. Взвесь полученных клеток отмывается двукратно в растворе PBS методом центрифугирования. В промаркированные пробирки для проточного цитометра с внутренним мыском вносят 100 мкл клеточной взвеси и добавляют моноклональные антитела, меченные различными флуорохромами, согласно панели исследования в объёмах рекомендованных фирмой-производителем с определением количества Т-лимфоцитов и их субпопуляций ( $CD3^+$  клетки) и В-лимфоцитов ( $CD19^+$  клетки), а также активационных маркеров указанных популяций лимфоцитов.

1.4. Образцы перемешивают на вортексе и инкубируют 20 минут в темноте при комнатной температуре. После инкубации в пробирки вносят по 100 мкл лизирующего раствора, содержащего 3,4% формальдегида.

1.5. Тщательно перемешанные на вортексе образцы, инкубируют 10 минут в темноте при комнатной температуре. В пробирки вносят по 1 мл дистиллированной воды. Образцы перемешивают на вортексе и инкубируют 10 минут при комнатной температуре без доступа света, затем исследуют на проточном цитофлуориметре.

1.6. Отбирают образцы суспензии с количеством Т-лимфоцитов ( $CD3^+$  клетки) не менее 40,8%, В-лимфоцитов ( $CD19^+$  клетки) не менее 29,4%.

2. Этап культивирования:

2.1. Забор крови из вены у пациента производят в количестве 5-10 мл в пробирку с гепарином (25 ЕД/мл). Пробирка с кровью должна быть доставлена в лабораторию в течение 2-х часов.

2.2. Содержимое пробирки осторожно перемешивают и оставляют на 60 минут в термостате при  $37^{\circ}C$  для осаждения эритроцитов.

2.3. После инкубации в термостате надосадочный слой плазмы, обогащенный лейкоцитами, отбирают в отдельную стерильную пробирку и определяют количество лейкоцитов в 1 мл.

2.4. Далее взвесь лейкоцитов разводят питательной средой RPMi-1640 с глутамином таким образом, чтобы в 1 мл содержалось 1-2 млн лейкоцитов, 20% аутологичной плазмы и 80% культуральной среды.

Полученную смесь помещают в три стерильные пластиковые флаконы объемом по 5 мл для культивирования в течение 3-х дней:

- контрольную реакцию проводят культивированием в среде № 1: RPMi-1640 с глутамином в термостате при 37°C;

- в среде № 2: RPMi-1640 с глутамином и 0,1 мл лимфоцитарного диагностикума;

- в среде № 3: RPMi-1640 с глутамином и 0,1 мл ФГА.

После завершения культивирования проводят иммунофенотипирование клеточных взвесей из всех образцов (этап 3).

3. Этап иммунофенотипирования лимфоцитов после культивирования с фитогемаглютинином (ФГА), донорским лимфоцитарным диагностикумом:

3.1. Производят двукратную отмывку клеточной взвеси в стандартном растворе PBS методом центрифугирования (по 5 мин, при 250g, при комнатной температуре).

3.2. Супернатант удаляют, добавляют 400 мкл стандартного раствора PBS, клеточную взвесь перемешивают вихревым смесителем.

3.3. Пробирки для проточного цитометра маркируют, согласно панели исследования. В каждую пробирку вносят МАТ, в объёмах рекомендованных фирмами-производителями, добавляют по 100 мкл клеточной взвеси, перемешивают вихревым смесителем. Используется следующая панель МАТ: CD3/Anti-HLA-DR.

3.4. Пробы перемешают на вортексе и инкубируют 15 минут при комнатной температуре без доступа света.

3.5. Во все пробирки добавляют по 100 мкл лизирующего раствора. Пробы перемешивают на вортексе и инкубируют 10 минут при комнатной температуре без доступа света.

3.6. Во все пробирки добавляют по 1000 мкл дистиллированной воды. Пробы перемешивают на вортексе и инкубируют 20 минут при комнатной температуре без доступа света.

3.7. Производится анализ на проточном цитофлуориметре.

4. Этап интерпретации результатов.

Для субпопуляции  $CD3^+HLA-DR^+$  рассчитывают коэффициент прироста (КП) удельного веса субпопуляции в культуре с лимфоцитарным диагностикумом по отношению к ее удельному весу в соответствующей монокультуре:

$$КП_{CD3^+HLA-DR^+_{лд}} = \frac{(CD3^+HLA-DR^+_{лд} - CD3^+HLA-DR^+_{кон}) \times 100}{CD3^+HLA-DR^+_{кон}}$$

где:

$CD3^+HLA-DR^+_{лд}$  – относительное число клеток субпопуляции  $CD3^+HLA-DR^+$  в культуре лимфоцитов пациента с лимфоцитарным диагностикумом (ЛД), %;

$CD3^+HLA-DR^+_{кон}$  – относительное число клеток субпопуляции  $CD3^+HLA-DR^+$  в монокультуре пациента (кон), %.

Для контроля технологии выполнения исследования необходимо оценить коэффициент прироста субпопуляции  $CD3^+HLA-DR^+$  в среде №1 (кон) и в среде №3 с добавлением фитогемаглютина (ФГА), как универсального активатора Т-лимфоцитов.

$$КП_{CD3+HLA-DR+фра} = \frac{(CD3^+HLA-DR^+_{фра} - CD3^+HLA-DR^+_{кон}) \times 100}{CD3^+HLA-DR^+_{кон}}$$

где:

$CD3^+HLA-DR^+_{фра}$  – относительное число клеток субпопуляции  $CD3^+HLA-DR^+$  в культуре лимфоцитов пациента с фитогемаглютинином (ФГА), %;

$CD3^+HLA-DR^+_{кон}$  – относительное число клеток субпопуляции  $CD3^+HLA-DR^+$  в монокультуре пациента (кон), %.

При этом  $КП_{CD3+HLA-DR+фра}$  должен иметь положительное значение.

Таблица – Интерпретация результатов оценки иммунного статуса пациентов с хронической болезнью почек при органной трансплантации

$КП_{CD3+HLA-DR+фра}$	$КП_{CD3+HLA-DR+лд}$	Аллогенный иммунный ответ
+	+	+
+	-	-
-	+	Нарушение технологии выполнения исследования
-	-	

Таким образом, положительный коэффициент прироста  $CD3^+HLA-DR^+_{лд}$  подтверждает положительный аллогенный иммунный ответ.

Данная оценка иммунологического статуса может быть использована в комплексном подходе определения тактики ведения пациентов с хронической болезнью почек при органной трансплантации с целью индивидуализации схем иммуносупрессивной терапии.

## **ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ**

При правильном использовании метода ошибки в оценке результатов исключены.