

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Е.Л. Богдан

«» 2025 г.

Регистрационный № 034-0625

**МЕТОД ПРОГНОЗИРОВАНИЯ НЕБЛАГОПРИЯТНОГО
ТЕЧЕНИЯ ВТОРИЧНЫХ ГЛОМЕРУЛОПАТИЙ**

(инструкция по применению)

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: учреждение образования
«Белорусский государственный медицинский университет», учреждение
здравоохранения «2-я городская детская клиническая больница»
г. Минска

АВТОРЫ: к.м.н., доцент Летковская Т.А., к.м.н., доцент Савош В.В.,
к.м.н., доцент Дмитриева М.В., д.м.н., профессор Байко С.В., Тур Н.И.,
Дудко А.П., Трухан М.П.

Минск, 2025

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод прогнозирования неблагоприятного течения вторичных гломерулопатий при АНЦА-ассоциированных васкулитах и/или хронических вирусных гепатитах В или С (развитие хронической болезни почек 4 или 5 стадий в течение 3 лет), который может быть применен в комплексе медицинских услуг, направленных на вторичную медицинскую профилактику их осложнений. Метод, изложенный в настоящей инструкции по применению, предназначен для врачей-патологоанатомов, врачей-нефрологов, врачей-ревматологов, иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам, страдающим заболеваниями почек в стационарных и (или) амбулаторных условиях, и (или) условиях отделения дневного пребывания.

1. Показания к применению: васкулиты, ассоциированные с АНЦА антителами (отсутствуют в МКБ-10; МКБ-11 – 4A44A), вирусный гепатит В (В18.1), вирусный гепатит С (В18.2).

2. Противопоказания к применению: соответствующие таковым к применению медицинских изделий, необходимых для реализации метода, изложенного в настоящей инструкции.

3. Перечень необходимых медицинских изделий, реагентов, расходных материалов и т.п.:

1. Аппарат для автоматической проводки гистологического материала.

2. Микротом.

3. Предметные и покровные стекла, заливочная среда, ксилол, спирт этиловый различных концентраций.

4. Гистологические красители: гематоксилин, эозин, «Трихром», набор реактивов для окраски по MSB (martius-scarlet-blue), трихромом по Массону, для проведения ШИК (PAS) реакции, серебрения по Джонсу.

5. Реактивы для иммуногистохимии: антитела к иммуноглобулинам классов А, М и G, фракций комплемента C3 и C1q, антимиелопероксидазным антителам (anti-MPO), фибронектину; демаскировочный буфер, 3% перекись водорода, бычий сывороточный альбумин, раствор для разведения антител, полимерная система визуализации, диаминобензидин, промывочный трис-буфер, фосфатный буфер, водоотталкивающий ограничитель, гематоксилин Майера.

6. Лабораторная посуда.

7. Микроскоп с фотокамерой или цифровой сканер гистологических препаратов

8. Программа для морфометрии на сканированных препаратах (Aperio Image Score или аналогичные).

9. Холодильник.

4. Технология использования предлагаемого метода

Метод, изложенный в настоящей инструкции, реализуется в несколько этапов.

4.1. Изготовление окрашенных срезов нефробиоптатов.

4.1.1. Из парафиновых блоков пункционных нефробиопсий изготавливают гистологические срезы толщиной 3-4 мкм, которые депарафинируют в ксилоле, обезвоживают в спиртах возрастающей концентрации и окрашивают гематоксилином и эозином, трихромом по Массону, по MSB, реактивом Шиффа (ШИК-реакция), проводят серебрение по Джонсу.

4.1.2. Для иммуногистохимического (ИГХ) окрашивания производят блокирование эндогенной пероксидазы путем обработки срезов 3%-м раствором перекиси водорода в течение 20 мин. Срезы обрабатывают в нагреваемой барокамере (например, типа Pascal) в демаскировочном буфере (pH 9.0) при температуре 125°C и давлении 25 psi в течение 30 секунд. Неспецифическое связывание блокируют 1%-м бычьим сывороточным альбумином в трис-буфере (pH 7,6) в течение 30 минут. На гистологический срез наносятся первичные антитела к anti-MPO, фибронектину в заранее подобранном разведении, инкубируют их в течение 18 часов в холодильнике (+4°C). Обязательные требования при выборе первичного антитела: указание в спецификации производителя на возможность использования на формалин-фиксированном материале (маркировка «for formalin-fixed tissues»). После интенсивного промывания в трис-буфере осуществляют визуализацию результата реакции при помощи полимерной системы визуализации и диаминобензидина (ДАБ) в соответствии с рекомендациями производителя. Длительность инкубации в ДАБ устанавливают в каждой лаборатории индивидуально, для чего необходимо наблюдать процесс появления коричневого окрашивания под микроскопом. Время окрашивания можно считать достаточным, если структуры, подлежащие окрашиванию, приобрели ярко-золотисто-коричневый цвет, в то время как фоновое окрашивание отсутствует. 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 покрывают 1%-м раствором бычьего сывороточного альбумина. В качестве положительного контроля

используют положительные контрольные образцы или сыворотки, рекомендуемые производителем первичных антител. Окраска расценивается как положительная только при отсутствии окрашивания в отрицательном контрольном препарате и, наоборот, как отрицательная при наличии окрашивания в положительном контрольном препарате. Срезы контрокрашивают гематоксилином Майера и заключают в заливочную среду.

4.2. Оценка морфологических изменений в ткани почек.

4.2.1. Оценка гистологических изменений в ткани почек.

Оценка гистологических изменений в ткани почек проводится с использованием световой микроскопии срезов, окрашенных гематоксилином и эозином, реактивом Шиффа (ШИК-реакция), трихромом по Массону, по MSB, по Джонсу.

Оценивают распространенность изменений в биоптате: очаговые (фокальные) – изменено менее 50% от общего числа клубочков, диффузные – изменено 50% клубочков и более. Изменения в отдельном клубочке могут быть сегментарными (изменена часть (сегмент) клубочка) или глобальными (изменен весь клубочек).

Отмечают наличие и степень выраженности эндокапиллярной (мезангиальные клетки и эндотелиоциты) и экстракапиллярной (эпителиоциты капсулы Шумлянско-Боумана) пролиферации, инфильтрацию клубочка нейтрофильными лейкоцитами, указывают на расширение мезангиального матрикса. Следует обратить внимание также на строение базальных мембран (БМ) капилляров клубочка: при различных вариантах гломерулопатий может отмечаться утолщение капиллярной БМ, а также ее удвоение (расщепление), отложение вдоль мембраны депозитов с формированием «шипиков».

Указывают морфологический тип гломерулярного поражения: мезангио-пролиферативный, мембрано-пролиферативный, с экстракапиллярной пролиферацией (ЭП). Для мезангио-пролиферативного морфологического типа характерно наличие 4 и более рядом расположенных мезангиальных клеток с или без расширения мезангиального матрикса. Предпочтительно проводить оценку в препаратах, окрашенных реактивом Шиффа. Для мембрано-пролиферативного морфологического типа поражения характерны гиперклеточность мезангия (4 и более рядом расположенных мезангиальных клеток) и расширение его матрикса, неравномерное диффузное утолщение БМ капилляров и ее «удвоение» («рельсовидная» БМ), что обусловлено проникновением мезангиальных клеток на периферию капиллярных петель (интерпозиция мезангия) под эндотелием и синтезом ими внеклеточного матрикса. Предпочтительно проводить оценку в препаратах, окрашенных реактивом Шиффа и по Джонсу. Критерием морфологического типа гломерулярного поражения с ЭП (формированием полулуний) является обнаружение двух и более слоев клеток в полости капсулы Шумлянско-Боумана, с наличием или отсутствием между клетками в мочевом пространстве коллагеновых волокон, дающие характерную окраску трихромом по Массону (клеточные, фиброзно-клеточные и фиброзные полулуния).

Также оценивают характер и выраженность тубуло-интерстициальных и сосудистых изменений (дистрофия канальцевого эпителия, фиброз и воспалительная инфильтрация в строме почки, сосудистая патология – гиалиноз, фибриноидный некроз).

4.2.2. Оценка иммуногистохимических изменений.

Обязательно оценивается ИГХ экспрессия иммуноглобулинов классов А, М и G, фракций комплемента С3 и С1q в различных структурах почки (наличие мезангиальных, субэндотелиальных, интрамембранных и/или субэпителиальных депозитов в клубочках, депозитов в сосудах разного калибра, в тубулярных базальных мембранах и других участках). Отмечается распространенность гломерулярной экспрессии (фокальная – < 50% клубочков, диффузная – ≥ 50% клубочков; сегментарная – менее, чем в половине капиллярных петель, глобальная – в половине и более капиллярных петель).

4.2.3. Оценка экстракапиллярной пролиферации с расчетом индекса полулуний.

Для расчета индекса полулуний (ИП) подсчитывают все имеющиеся в биоптате несклерозированные клубочки и клубочки с полулуниями. Показатели полулуний клубочков оценивают по балльной шкале для каждого клубочка в соответствии с процентом ЭП по длине окружности (таблица).

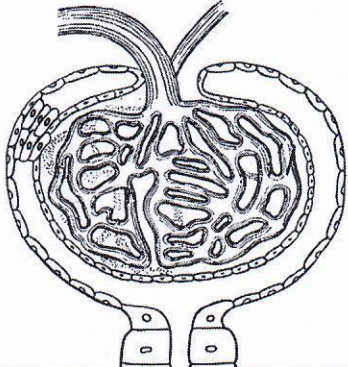
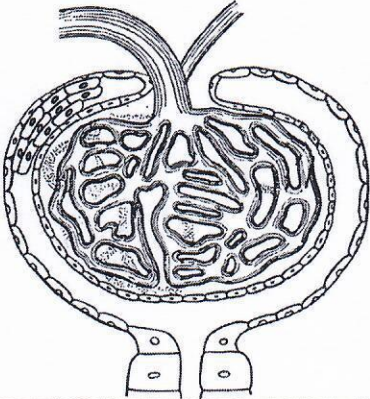
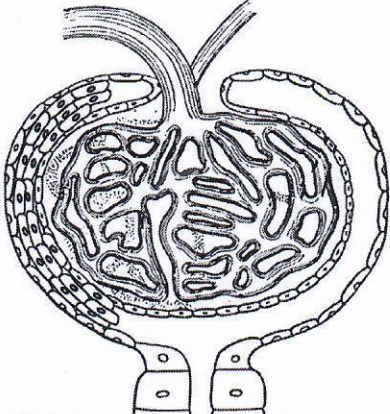
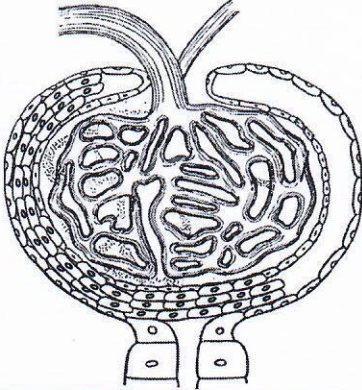
ИП рассчитывают с учетом количества гломерул с полулуниями и степени вовлечения окружности капсулы каждого клубочка по формуле:

$$\text{ИП} = \frac{\sum (rx1 + rx2 + rx3 + rx4)}{N}$$

г – количество клубочков с соответствующим баллом ЭП

N – количество несклерозированных клубочков в биоптате

Таблица. Бальная оценка показателя полулуний клубочков.

Размер полулуния в клубочке по окружности	Баллы	Визуализация
< 10%	1	
от 10 до 25%	2	
от 25 до 50%	3	
> 50%	4	

4.2.4. Полуколичественная оценка степени выраженности интерстициального фиброза.

Гистологические препараты, окрашенные по Масону и по MSB, просматриваются под световым микроскопом с полуколичественной оценкой выраженности интерстициального фиброза в баллах: 0 – отсутствие изменений в почечном интерстиции, 1 балл – очаговое незначительное или умеренное расширение межканальцевой стромы с вовлечением менее 25% коркового слоя, 2 балла – умеренное диффузное или очаговое выраженное расширение межканальцевой стромы с вовлечением от 26 до 50% коркового слоя, 3 балла – наличие диффузного выраженного интерстициального фиброза с вовлечением более 51% коркового слоя.

4.2.5. Оценка экспрессии фибронектина в ткани почек.

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 маркера может быть количественной (например, с использованием программы для морфометрии Aperio Image Scope) или полуколичественной.

Количественная оценка экспрессии фибронектина выполняется путем анализа цифрового изображения, полученного с помощью микроскопа и фотокамеры или сканера гистологических слайдов. Для микрофотографий рекомендуется использовать увеличение 400, минимальное количество полей зрения – 5. Использование алгоритма «positive pixel count 9,0» программы для морфометрии. 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):

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

Полуколичественная оценка выраженности экспрессии фибронектина проводится с помощью светового микроскопа; анализируется распространенность и интенсивность ИГХ окрашивания в препарате по следующим критериям:

«-» — экспрессия отсутствует;

«+» — экспрессия представлена очаговым бледно-коричневым окрашиванием внеклеточного матрикса межканальцевой стромы;

«++» — экспрессия представлена интенсивно окрашенными участками экстрацеллюлярного матрикса между почечными канальцами, а также в перигломерулярной зоне большинства клубочков;

«+++» — экспрессия представлена интенсивным коричневым окрашиванием участков расширенной межканальцевой стромы, а также внеклеточного матрикса перигломерулярной стромы всех клубочков в препарате.

4.2.6. Оценка экспрессии anti-MPO в ткани почек.

Результат ИГХ выявления anti-MPO антител представлен в виде очагового окрашивания мезангиума клубочков в коричневый цвет, наличия гранулярных депозитов в гломерулярных, тубулярных

базальных мембранах, капсуле Шумлянско-Боумена, стенках сосудов почки, а также зонах экстракапиллярной пролиферации.

4.3. Определение вероятности неблагоприятного течения вторичных гломерулопатий.

4.3.1. При АНЦА-ассоциированных васкулитах факторами неблагоприятного течения вторичных гломерулопатий являются (наличие одного или более факторов):

– степень выраженности экстракапиллярной пролиферации с индексом полулуний равным или более 1,5;

– положительное ИГХ окрашивание с anti-MPO антителами более, чем в 50% клубочков биоптата (мезангиальные и субэндотелиальные депозиты и/или депозиты вдоль капсулы Шумлянско-Боумена, и/или в участках экстракапиллярной пролиферации) независимо от интенсивности ИГХ экспрессии.

4.3.2. При вирусных гепатитах В или С факторами неблагоприятного течения вторичных гломерулопатий являются (наличие одного или более факторов):

– мембрано-пролиферативный морфологический тип гломерулярного поражения;

– диффузная глобальная экспрессия иммуноглобулинов G и M классов, C1q и C3 фракций комплемента в виде субэндотелиальных и/или субэпителиальных депозитов в периферических петлях клубочков;

– интерстициальный фиброз 2-3 балла с вовлечением более 25% коркового слоя;

– выраженное ИГХ окрашивание с применением антител к фибронектину, что соответствует показателю экспрессии этого маркера более 0,25.

4.4. Принятие управленческого решения.

При обнаружении вероятности неблагоприятного течения вторичных гломерулопатий проводится коррекция проводимой терапии, при отсутствии – продолжается стандартное лечение.

5. Перечень возможных осложнений или ошибок при выполнении метода и пути их устранения

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 избежание подобных ошибок необходимо при гистохимическом и иммуногистохимическом окрашивании строго соблюдать все методические требования.