

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ  
БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ



Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневиц

12 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

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 пациентов 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 используемых сокращений**

АТ –антитела

ДАБ – диаминобензидин

ИГХ – иммуногистохимическое исследование

ФСГС – фокальный сегментарный гломерулярный склероз

#### **Показания к применению:**

гломерулярные болезни (N00-N08).

**Противопоказания к применению:** отсутствуют.

## ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАГЕНТОВ, РАСХОДНЫХ МАТЕРИАЛОВ

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 к человеческому белку WT1 и CD80.
10. Демаскировочный и промывочный буферы
11. Вторичные HRP-конъюгированные антитела
12. Диаминобензидин
13. Заливочная среда.

### 1. 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. После этого срезы обрабатываются в нагреваемой барокамере Pascal в цитратном буфере (pH 6.0) при температуре 125°C и давлении 25 psi в течение 2,5 минут. Вместо барокамеры может использоваться микроволновая печь при мощности 700-800W, однако в этом случае время обработки существенно увеличивается (16 минут) и ухудшается качество препарата. Неспецифическое связывание блокируется 1% бычьим сывороточным альбумином в трис-буфере (pH

7,6) 30 мин, после чего наносятся первичные антитела в рекомендованных производителем разведениях. Инкубация с первичным антителом производится в течение 18 часов в холодильнике (+4°C).

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 CB80 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.

## 2. МОРФОМЕТРИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ЭКСПРЕССИИ БИОМОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ

2.1. Для морфометрического анализа экспрессии WT-1 необходимо при помощи микроскопа с цифровой камерой сфотографировать пять случайно выбранных клубочков биоптата (увеличение 400). В случаях 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 произвести подсчет количества 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:

$$\text{Число подоцитов на один клубочек} = \frac{\text{число WT1-позитивных ядер}}{\text{число клубочков}}$$

2.2. Оценка экспрессии CD80 в клубочках и канальцевом эпителии проводится 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).

### 3. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ МОРФОМЕТРИЧЕСКОЙ ОЦЕНКА ЭКСПРЕССИИ БИОМОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ

3.1. 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 клеток на один клубочек

3.2. Наличие умеренно-выраженной и выраженной (2++ и 3+++) экспрессии 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 ИССЛЕДОВАНИЯ 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 проведении методики.

Во избежание возникновения ошибочных результатов необходимо строго соблюдать все методические требования при выполнении биопсии и проведении гистологического, иммуногистохимического исследования.