

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

«УТВЕРЖДАЮ»

Первый заместитель Министра
Д.Л. Пиневич
2013 г.
Регистрационный № 159-1113

**МЕТОД ДИАГНОСТИКИ ХРОНИЧЕСКОЙ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ
ДИСФУНКЦИИ ПРИ ЛАКУНАРНЫХ ИНФАРКТАХ МОЗГА**

Инструкция по применению

Учреждения-разработчики:

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр неврологии и нейрохирургии»; Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий»

Авторы:

Л.Н. Анацкая, к. м. н.; Г.К. Недзведь, д. м. н., профессор;

Н.В. Гончарова; Г.Я. Хулуп, д. м. н., профессор; М.П. Потапнев, д. м. н., профессор; С.В. Марченко

Минск, 2013

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневиц

05.12.2013

Регистрационный № 159-1113

**МЕТОД ДИАГНОСТИКИ ХРОНИЧЕСКОЙ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ
ДИСФУНКЦИИ ПРИ ЛАКУНАРНЫХ ИНФАРКТАХ МОЗГА**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: ГУ «Республиканский научно-практический центр неврологии и нейрохирургии», ГУ «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий»

АВТОРЫ: канд. мед. наук Л.Н. Анацкая, д-р мед. наук, проф. Г.К. Недзьведь, Н.В. Гончарова, д-р мед. наук, проф. Г.Я. Хулуп, д-р мед. наук, проф. М.П. Потапнев, С.В. Марченко

Минск 2013

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод диагностики хронической эндотелиальной дисфункции в острейшем периоде лакунарных инфарктов мозга (ЛИМ) при церебральной микроангиопатии (ЦМА) по степени выраженности компенсаторного постинсультного ангиогенеза в ответ на острую церебральную ишемию, метод определения наиболее информативных фенотипов эндотелиальных клеток-предшественников (ЭКП).

Инструкция предназначена для врачей-неврологов, врачей лабораторной диагностики.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Проточный лазерный цитофлуориметр.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Диагностика хронической эндотелиальной дисфункции в острейшем периоде лакунарных инфарктов мозга при церебральной микроангиопатии.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ ЛАКУНАРНОГО ИНФАРКТА МОЗГА ПРИ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ МИКРОАНГИОПАТИИ НА ФОНЕ ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ МОЗГА

1. Легкий или умеренный неврологический дефицит — сенсорный моторный или смешанный в пределах одной конечности или по гемитипу, атактический гемипарез или дизартрия в сочетании со свисающей кистью, возникающий в первые минуты заболевания.

2. Отсутствие нарушений высших корковых функций при локализации очага инфаркта в доминантном полушарии.

3. Отсутствие общемозговых симптомов.

4. Дебют заболевания в виде остро возникшего когнитивного дефицита и псевдобульбарного синдрома у пациентов с выраженной сосудистой лейкоэнцефалопатией.

5. Наличие таких факторов риска, как пожилой возраст, мужской пол, артериальная гипертензия, сахарный диабет, гиперлипидемия, курение, предшествующие стереотипные транзиторные ишемические атаки, немые ЛИМ, хроническая почечная недостаточность, хронические обструктивные заболевания легких.

6. Течение заболевания по типу «малого инсульта».

7. Частое развитие депрессии в остром и восстановительном периоде ЛИМ.

8. Возможен когнитивный дефицит и деменция при синергии с немыми ранее перенесенными ЛИМ.

9. Локализация очага инфаркта при нейровизуализации (РКТ, МРТ) в белом веществе полушарий головного мозга, подкорковых ганглиях, внутренней капсуле, лучистом венце, семиовальном центре, мосте и стволе, диаметр которого

в остром периоде может составлять 15–20 мм, в позднем восстановительном — 7–10 мм, через год — менее 5 мм.

10. Визуализации очага ЛИМ преимущественно на МРТ головного мозга. При РКТ головного мозга в 15–25% случаев ЛИМ в остром периоде не визуализируются из-за малого очага инфаркта.

11. Наличие лакун, очагов лейкоареоз в белом веществе полушарий головного мозга, подкорковых ганглиях и перивентрикулярно по данным нейровизуализации (РКТ, МРТ), гипертензивная или атеросклеротическая ретинальная микроангиопатия при исследовании глазного дна, свидетельствующие о церебральной микроангиопатии и хронической ишемии мозга.

12. Признаки хронической цереброваскулярной недостаточности при зонографической диагностике магистральных артерий головы.

ДИАГНОСТИКА ХРОНИЧЕСКОЙ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ ПО СТЕПЕНИ ВЫРАЖЕННОСТИ КОМПЕНСАТОРНОГО АНГИОГЕНЕЗА В ОСТРОМ ПЕРИОДЕ ЛАКУНАРНЫХ ИНФАРКТОВ МОЗГА ПРИ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ МИКРОАНГИПАТИИ НА ФОНЕ ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ МОЗГА

Для диагностики хронической эндотелиальной дисфункции в острейшем периоде ЛИМ при ЦМА на фоне ХИМ, определяют уровень ЭКП с более ранним (CD133⁺VEGFR-2⁺CD34⁺) и более поздним фенотипическим профилем (CD31⁺CD146⁺CD144⁺vWF⁺) в процентах или абсолютных числах в первые 48 ч от начала ЛИМ с использованием методов проточной иммуноцитометрии на лазерном проточном цитофлуориметре. При снижении уровня ЭКП как с более ранним фенотипическим профилем, так и с более зрелым на 15% и более в сравнении с данными здоровых доноров диагностируют хроническую эндотелиальную дисфункцию артериального микроциркуляторного русла в виде ослабления компенсаторного ангиогенеза в ответ на острую церебральную ишемию. Ослабление постинсультного васкулогенеза в острейшем периоде ЛИМ позволяет обосновать необходимость его фармакологической индукции для предупреждения таких осложнений, как постинсультная деменция и паркинсонизм, и дальнейшего прогрессирования ЦМА.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) пациентов в первые 48 ч ЛИМ при церебральной микроангиопатии на фоне ХИМ выделяют из стабилизированной гепарином (20 ед./мл крови) свежезаготовленной венозной крови путем лизирования эритроцитов специальным буфером. Изолированные МНК дважды отмывают фосфатно-солевым раствором (PBS, pH 7,2), содержащим 0,5% термоинактивированной эмбриональной телячьей сыворотки. Для идентификации ЭКП используют поверхностные антигенспецифичные моноклональные антитела (МКА) в комбинации CD31/CD146/CD34, CD31/CD144/CD34, CD31/KDR/CD34, CD31/FLT1/CD34, CD36/CD34, CD31/vWF/CD34, CD31/CD133/CD34, CD31/CD45/CD34, меченные флуоресцеин-

5-изотиоцианатом (FITC), фикоэритрином (PE) и фикоэритрин-цианином 5 (PC5) соответственно и вторичные антимышьиные МКА IgG₁-PE в рабочем разведении 1:1000 и антикроличьи IgG₁-PE в рабочем разведении 1:100. В качестве контроля аутофлуоресценции применяют неокрашенные мононуклеарные клетки периферической крови, для изотипического контроля — подкласс иммуноглобулинов IgG₁-FITC/IgG₁-PE/IgG₁-PC5 либо вторичные антимышьиные моноклональные антитела IgG₁-PE в рабочем разведении 1:1000 и антикроличьи IgG₁-PE в рабочем разведении 1:100. В целях коррекции неспецифического связывания в образцы МПК вносят реагенты для блока Fc-рецепторов и смешивают с содержимым пробирок.

Аналитическую цитометрию проводят на лазерном проточном цитофлуориметре. Проточный цитометр калибруют в соответствии с инструкцией фирмы-изготовителя, используя нагруженные флуорохромом микробусы и программы рабочей настройки оборудования для установки РМТ-вольтажа, флуоресцентной компенсации, а также контроля инструментальной чувствительности, наиболее оптимальной для использования. Для возбуждения флуоресценции применяют монохроматический луч лазера. В этом же луче измеряют переднее (forward scattering — FSC) и боковое (side scattering — SSC) под углом 90° светорассеивание анализируемых клеток. Регистрация данных и расчет процентного содержания маркированных клеток, характеризующего изучаемую популяцию, производятся с использованием программного обеспечения проточного цитофлуориметра. Популяции ЭКП оцениваются после выделения логического «гейта» лимфоцитов в Dot/Plot по их линейному (FSC) и боковому (SSC) светорассеиванию и по региону клеток CD34⁺ и CD31⁺. Степень чистоты популяции клеток не менее 94%. В каждой пробе анализируется не менее 200000 клеток.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Основная ошибка на этапе подготовки проточного лазерного цитофлуориметра к работе — неправильная его настройка. Для исключения ошибок требуется проверка работы цитометра; настройка дискриминатора, чувствительности каналов светорассеяния и флуоресценции; введение коэффициентов компенсации согласно алгоритму подготовки рабочих протоколов для анализа клеток периферической крови.