

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ



Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневич

2015г.

Регистрационный № 181-1115

МЕТОД ОЦЕНКИ РИСКА ОТТОРЖЕНИЯ И РАННЕЙ ДИСФУНКЦИИ
ТРАНСПЛАНТАТОВ ПЕЧЕНИ

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

Учреждение здравоохранения

«9-я городская клиническая больница» г. Минска

АВТОРЫ: к.м.н., доцент А.Е. Щерба, к.м.н. С.В. Коротков, Д.Ю. Ефимов, О.А. Лебедь, А.А. Коритко, А.И. Киреева, д.м.н., профессор О.О.Руммо.

Минск, 2015

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневиц

11.12.2015

Регистрационный № 181-1115

**МЕТОД ОЦЕНКИ РИСКА ОТТОРЖЕНИЯ И РАННЕЙ ДИСФУНКЦИИ
ТРАНСПЛАНТАТОВ ПЕЧЕНИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: УЗ «9-я городская клиническая больница»
г. Минска

АВТОРЫ: канд. мед. наук, доц. А.Е. Щерба, канд. мед. наук С.В. Коротков,
Д.Ю. Ефимов, О.А. Лебедь, А.А. Коритко, А.И. Киреева, д-р мед. наук, проф.
О.О. Руммо

Минск 2015

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкции) изложен метод оценки риска отторжения и ранней дисфункции трансплантатов печени на основе молекулярно-генетических, серологических и иммуногистохимических факторов. Метод может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на медицинскую профилактику осложнений после трансплантации всей или части печени от умершего донора со смертью мозга.

Метод, изложенный в настоящей инструкции, предназначен для врачей лабораторной диагностики и иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам, перенесшим трансплантацию печени.

Термин «ранняя дисфункция трансплантата печени» в данной инструкции соответствует коду Т 86.4 «отмирание и отторжение или недостаточность трансплантата печени» по Международной классификации болезней X пересмотра.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Оптический микроскоп.
2. Микротом.
3. Программируемый нагревательный блок (амплификатор) для полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ).
4. Центрифуга.
5. Миницентрифуга-вортекс.
6. Флуориметр.
7. ПЦР-бокс.
8. Анализатор для мультиплексного иммуноферментного анализа.
9. Гистопроцессор карусельного типа.
10. Одноразовые пробирки с антикоагулянтом.
11. Одноразовые пробирки объемом 1,5 мл.
12. Одноразовые пробирки для ПЦР-РВ объемом 0,2 мл.
13. Одноразовые сменные наконечники с фильтром и без фильтра. микропипетки.

Реактивы и лекарственные средства:

- буферизованный формалин;
- парафин;
- моноклональные антитела;
- реагенты для иммуногистохимической окраски High-mobility group protein B1 (HMGB1), CD68;
- реагенты для определения уровня макрофагального воспалительного белка-1а (МВБ-1а) и гепатоцитарного фактора роста (ГФР) в плазме крови;
- набор для выделения ДНК из крови;
- ортоксилол «ЧДА»;
- спирт этиловый ректификованный;

- реагенты для постановки и проведения ПЦР-РВ.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Ортотопическая трансплантация печени.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Оценка риска отторжения трансплантата печени

Для оценки риска отторжения трансплантата печени определяют содержание МВБ-1а в крови из нижней полой вены через 1 ч после реперфузии.

Определение содержания МВБ-1а в крови из нижней полой вены

1. На этапе выполнения трансплантации печени производится взятие пробы крови из нижней полой вены через 1 ч после реперфузии объемом 3,0–5,0 мл в стерильную пробирку без антикоагулянта.

2. Пробирку с кровью центрифугируют в течение 10 мин при скорости 1500 об./мин.

3. Полученная сыворотка отбирается в стерильные микропробирки объемом 1,5 мл.

4. Выполняется анализ на мультиплексном иммуноферментном анализаторе согласно инструкции по применению к медицинскому изделию.

5. Учет и анализ полученных результатов проводится при помощи программы xRoent. Для построения стандартной кривой используются растворы с содержанием эталона в следующих концентрациях: 3,2; 16; 80; 400; 2000 пг/мл. Самый нижний и самый верхний стандарты на калибровочной кривой принимаются в качестве количественных пределов. При статистической обработке результатов уровни цитокинов, выходящие за нижнюю границу чувствительности метода, принимаются за значение нижней границы (пг/мл). Если концентрация цитокина превышает верхнюю границу чувствительности, то величину принимают равной верхней границе.

Установление величины риска развития отторжения трансплантата печени

Содержание МВБ-1а в крови из нижней полой вены через 1 ч после реперфузии более 40,0 нг/мл свидетельствует о высоком риске развития острого отторжения трансплантата печени; показатель менее 40,0 нг/мл — о низком риске развития острого отторжения трансплантата печени.

Управленческие решения

При выявлении высокого риска отторжения трансплантата печени необходимо использовать индукцию иммуносупрессии, а также раннее назначение такролимуса и мофетила микофенолата с учетом нежелательных явлений. При определении низкого риска развития острого отторжения необходимо использовать клинический

протокол трансплантации печени (гл. 6, п. 1, приложение 6 к приказу № 6 Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 05.01.2010).

Оценка риска ранней дисфункции трансплантата печени

Для оценки риска развития ранней дисфункции трансплантата печени последовательно определяют: а) полиморфизм rs913930 в гене TLR4 и генотип донора печени; б) содержание гепатоцитарного фактора роста (ГФР) в крови из воротной вены через 2 ч после реперфузии; в) степень экспрессии High-mobility group protein B1 (HMGB1) и кластера дифференцировки CD68+ в биоптатах печени доноров и постреперфузионных биоптатах методом иммуногистохимии.

Определение полиморфизма rs913930 в гене TLR4 и генотипа донора печени

1. Выделение ДНК из биологического материала. После констатации смерти мозга у донора берут пробу цельной крови из периферической вены в пробирку с антикоагулянтом. ДНК из крови выделяют стандартным набором реагентов согласно прилагаемой инструкции по применению.

2. Определение концентрации выделенной ДНК. Концентрацию выделенной ДНК измеряют на флуориметре согласно прилагаемой инструкции по применению.

3. Проведение ПЦР-РВ. ПЦР-РВ проводят с использованием набора реагентов в следующей последовательности:

3.1. Готовят необходимый объем амплификационной смеси, которая содержит 12,5 мкл мастер микс и по 0,3 мкмоль прямого и обратного праймера (таблица 1) (**WF-30 – R-30** и **MF-30 – R-30**) из расчета общего объема пробы 25 мкл на реакцию. Каждый образец амплифицируют с использованием обеих пар праймеров в дуплете.

Таблица 1. — Праймеры для определения полиморфизма rs 913930 в гене TLR4

| Название | Последовательность праймеров |
|----------|---------------------------------|
| WF-30 | 5'-GTAATTCCCAAATCTGTCTGTGCtC-3' |
| MF-30 | 5'-GTAATTCCCAAATCTGTCTGTGCtT-3' |
| R-30 | 5'-ATGACAAAGTTGAGCAGGTC- 3' |

3.2. В каждую пробирку для ПЦР вносят 20 мкл амплификационной смеси и 5 мкл ДНК образца (20–50 нг).

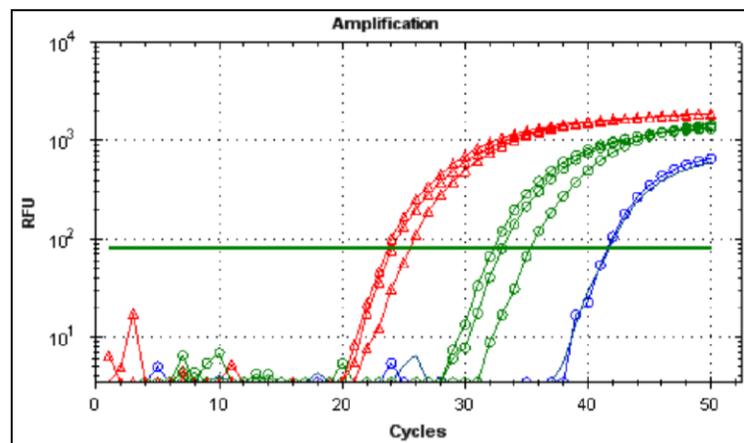
3.3. ОКО (отрицательный контрольный образец) — вносят 5 мкл.

3.4. Пробирки помещают в амплификатор и проводят ПЦР-РВ по программе: 95°C — 10 мин; 50 циклов: 95°C — 10 с, 59°C — 30 с, 62°C — 30 с.

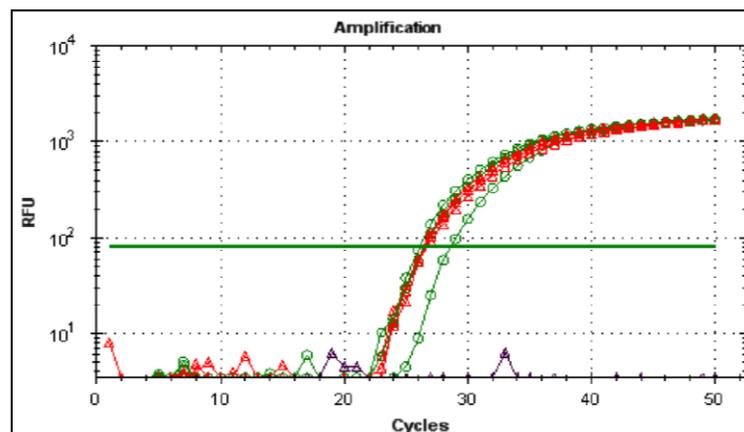
3.5. Определение генотипов и интерпретация полученных данных.

Обработку полученных результатов осуществляют с использованием стандартного программного обеспечения, дискриминацию аллелей и определение генотипов проводят по соотношению значений Ct (cycle threshold) после ПЦР-РВ с одной и другой парой праймеров.

A



B



C

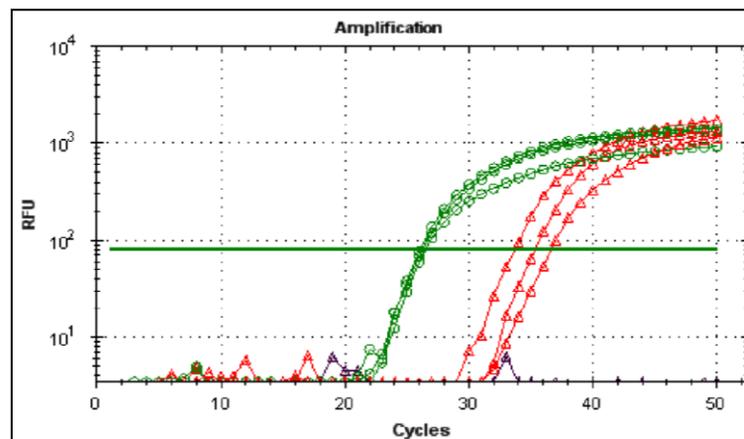


Рисунок 1. — ПЦР в реальном времени образцов: генотип ТТ (А), генотип ТС (В), генотип СС (С). Амплификация аллели Т — красный цвет, аллели С — зеленый цвет, контрольный образец — синий цвет

При полной комплементации матрицы реакция идет с большей эффективностью, чем в случае неспаренного нуклеотида на 3'-конце праймера и, следовательно, характеризуется меньшим значением Ct (рисунок 1).

Определение содержания ГФР в крови из воротной вены

Содержание ГФР в крови из воротной вены через 2 ч после реперфузии определяется по аналогичной технологии, описанной выше для МВБ-1а (ч. 1, п. 1).

Определение степени экспрессии High-mobility group protein B1 (HMGB1) и кластера дифференцировки CD68+ в биоптатах печени доноров и постреперфузионных биоптатах методом иммуногистохимии

1. На этапе операции back-table (биопсия № 1), а также через 2 ч после реперфузии во время трансплантации печени (биопсия № 2) выполняется биопсия из 2-го сегмента трансплантата печени (участок паренхимы размером 10×10 мм).

2. Исследуемый материал фиксируется в 10%-м нейтральном буферизованном формалине в течение 24 ч.

3. Гистологическая проводка материала осуществляется в автоматическом режиме с использованием гистопроцессора карусельного типа по стандартной методике. Адекватность фиксации и проводки материала является важнейшим фактором получения достоверного результата иммуногистохимического исследования.

4. Материал заливается в парафин.

5. При помощи ротационного электромеханического микротомы приготавливаются срезы толщиной 3 мкм, которые монтируются на высокоадгезивные стекла и подсушиваются в течение 12 ч при температуре 37°C.

6. Стекла с адгезированными срезами депарафинируются последовательно в трех сменах ортоксилла «ЧДА» по 5 мин, в двух сменах спирта этилового 96° по 3 мин, одной смене спирта этилового 80° 3 мин, двух сменах спирта этилового 70° по 3 мин при комнатной температуре.

7. Демаскировка антигенов (высокотемпературная предобработка) проводится с использованием:

а) CD68 — водяной бани при температуре 97°C в течение 40 мин (цитратный демаскировочный буфер pH = 6,0);

б) HMGB1 — микроволновой печи при температуре 99°C в течение 28 мин (демаскировочный буфер Tris/EDTA pH = 6,1), после чего стекла промываются и помещаются во влажную камеру.

8. Срезы обрабатываются 3%-й перекисью водорода для блокировки эндогенной пероксидазы в течение 10 мин.

9. Инкубация с первичными антителами проводится согласно протоколам каждого антитела (таблица 2).

10. Инкубация с использованием специализированной детекционной системы, время инкубации 30 мин при комнатной температуре.

11. В качестве хромогена применяется 3-диаминобензидин тетрагидрохлорид, приготовленный непосредственно перед использованием, время инкубации 10 мин при комнатной температуре.

12. Контрастирование ядер осуществляется гематоксилином Майера, затем срезы обезживаются в спиртах восходящей концентрации и заключаются в монтирующую среду на основе полистирола.

Таблица 2. — Протоколы иммуногистохимических реакций

| Первичное антитело | Клон, производитель | Разведение | Протокол инкубации |
|--|----------------------|------------|----------------------------------|
| Mouse Monoclonal Anti-CD68 | PG-M1 Abcam | 1:40 | 30 мин при комнатной температуре |
| Rabbit Polyclonal Anti-HMGB1 | Thermo Scientific | 1:100 | 30 мин при комнатной температуре |

13. Уровень экспрессии HMGB1 и CD68+ в биоптатах печени оценивается морфометрически с использованием автоматизированных систем обработки изображений.

Установление величины риска развития ранней дисфункции трансплантата печени

Для установления риска развития ранней дисфункции трансплантата печени последовательно оценивают: а) полиморфизм rs913930 в гене TLR4; б) содержание ГФР в крови из воротной вены через 2 ч после реперфузии; в) прирост экспрессии ядерного HMGB-1 в трансплантате (до и после реперфузии) и уровень экспрессии CD68+ в постреперфузионной биопсии трансплантата печени.

Генотип СС и/или С/Т rs913930 в гене TLR4 свидетельствует о высоком риске развития ранней дисфункции трансплантата печени и не требует дальнейшего определения содержания ГФР в крови из воротной вены и степени экспрессии HMGB1 и CD68+ в биоптатах печени. Генотип ТТ в последовательности rs913930 в гене TLR4 требует определения содержания ГФР в воротной вене через 2 ч после реперфузии, при этом значение ГФР более 7934 нг/мл свидетельствует о высоком риске ранней дисфункции трансплантата и не требует дальнейшего определения степени экспрессии HMGB1 и CD68+ в биоптатах печени. Содержание ГФР в воротной вене менее 7934 нг/мл требует иммуногистохимического исследования биоптатов трансплантата печени с выявлением степени экспрессии HMGB1 и CD68+, при этом прирост экспрессии ядерного HMGB-1 в трансплантате (до и после реперфузии) более 13% и уровень экспрессии CD68+ в постреперфузионной биопсии трансплантата более 48 клеток/мм² свидетельствует о высоком риске развития ранней дисфункции трансплантата печени.

Наличие и генотипа ТТ в последовательности rs913930 в гене TLR4, и содержания ГФР в воротной вене через 2 ч после реперфузии менее 7934 нг/мл, и прироста экспрессии ядерного HMGB-1 в трансплантате (до и после реперфузии)

менее 13%, и уровня экспрессии CD68+ в постреперфузионной биопсии трансплантата менее 48 клеток/мм² свидетельствуют о низком риске развития ранней дисфункции трансплантата печени.

Управленческие решения

При выявлении высокого риска развития ранней дисфункции трансплантата будет применяться «Метод предотвращения ишемически-реперфузионного повреждения и улучшения послеоперационной функции маргинального трансплантата печени» (рег. № 087-0813). При выявлении низкого риска развития ранней дисфункции трансплантата печени будет использоваться клинический протокол трансплантации печени (гл. 4, приложение 6 к приказу № 6 Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 05.01.2010).