

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ



Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневиц

Д.Л. Пиневиц 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

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, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на медицинскую профилактику послеоперационных 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 десятого пересмотра.

Перечень необходимых медицинских изделий, расходных материалов и лекарственных средств

- оптический микроскоп;
- микротом;
- программируемый нагревательный блок (амплификатор) для полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ);
- центрифуга;
- миницентрифуга-вортекс;
- флуориметр;
- ПЦР-бокс;
- анализатор для мультиплексного иммуноферментного анализа;
- гистопроцессор карусельного типа;
- одноразовые пробирки с антикоагулянтом;

- одноразовые пробирки объемом 1,5 мл;
- одноразовые пробирки для ПЦР-РВ объемом 0,2 мл;
- 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 к применению

Отсутствуют.

Описание технологии использования метода

I. Оценка риска отторжения трансплантата печени.

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

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

1.1. на этапе выполнения трансплантации печени производится взятие пробы крови из нижней полой вены через 1 час после реперфузии объемом 3,0-5,0 мл в стерильную пробирку без антикоагулянта;

1.2. пробирку с кровью центрифугируют в течение 10 минут при скорости 1500 об/мин;

1.3. полученная сыворотка отбирается в стерильные микропробирки объемом 1,5 мл;

1.4. выполняется анализ на мультиплексном иммуноферментном анализаторе, согласно инструкции по применению к медицинскому изделию;

1.5. учет и анализ полученных результатов проводится при помощи программы xPonent. 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 значения уровня цитокинов, выходящие за нижнюю границу чувствительности метода, принимаются за значение нижней границы в пг/мл. Если значение концентрации цитокина превышает верхнюю границу чувствительности, то его концентрацию принимают равной верхней границе.

2. Установление величины риска развития отторжения трансплантата печени

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

3. Управленческие решения

При выявлении высокого риска развития 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 (глава 6, пункт 1, приложение 6 к приказу № 6 министерства здравоохранения Республики Беларусь от 05 января 2010г).

II. 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 часа после реперфузии и в) степень экспрессии High-mobility group protein B1 (HMGB1) и кластера дифференцировки CD68+ в биоптатах печени доноров и постреперфузионных биоптатах методом иммуногистохимии.

1. Определение полиморфизма rs913930 в гене TLR4 и генотипа донора печени

1.1. выделение ДНК из биологического материала

После констатации смерти мозга у умершего донора выполняют взятие пробы цельной крови из периферической вены в пробирку с антикоагулянтом. ДНК из крови выделяют стандартным набором реагентов согласно прилагаемой инструкции по применению;

1.2. определение концентрации выделенной ДНК

Концентрацию выделенной ДНК измеряют на флуориметре согласно прилагаемой инструкции по применению;

1.3. проведение ПЦР-РВ

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

1.3.1. готовят необходимый объем амплификационной смеси, которая содержит 12,5 мкл мастер микс и по 0,3 μ М 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
1	WF-30	5'-GTAATTCCCAAATCTGTCTGTGCtC-3'
2	MF-30	5'-GTAATTCCCAAATCTGTCTGTGCtT-3'
3	R-30	5'-ATGACAAAGTTGAGCAGGTC- 3'

1.3.2. в каждую пробирку для ПЦР вносят 20 мкл амплификационной смеси и 5 мкл ДНК образца (20-50 нг);

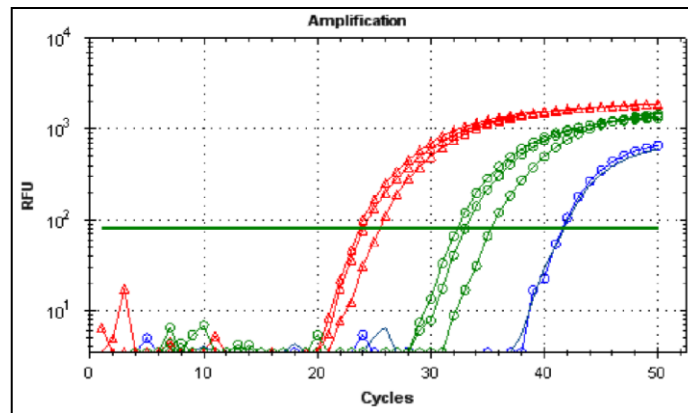
1.3.3. ОКО (отрицательный контрольный образец) вносят 5 мкл;

1.3.4. пробирки помещают в амплификатор и проводят ПЦР-РВ по программе: 95С – 10 мин; 50 циклов: 95С – 10 сек, 59С –30 сек, 62С–30 сек;

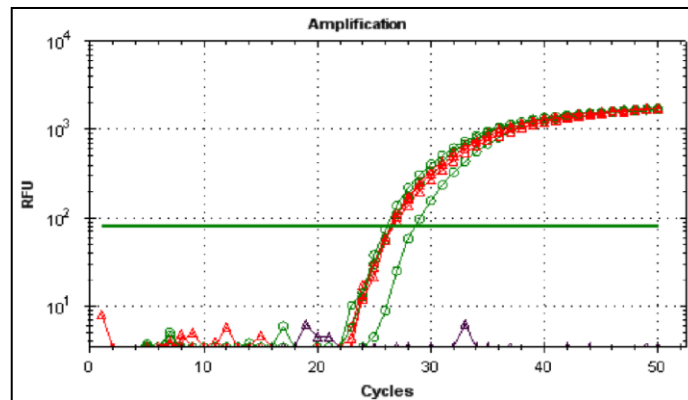
1.3.4. определение генотипов и интерпретация полученных данных

Обработку полученных результатов проводят 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

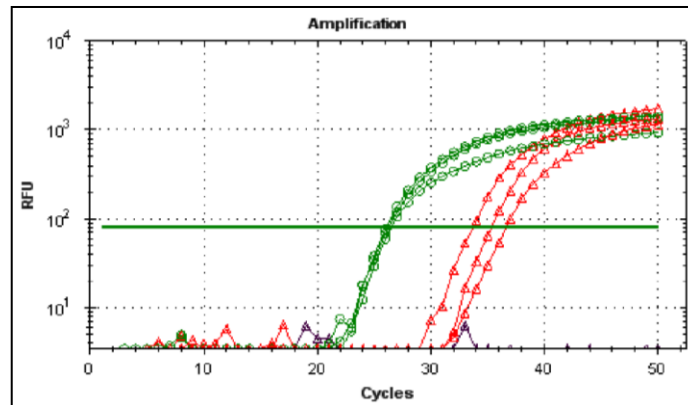


Рисунок 1. ПЦР в реальном времени образцов: генотип ТТ (А), генотип ТС (В), генотип СС (С). Амплификация аллели Т - красный цвет, аллели С - зеленый цвет, контрольный образец - синий цвет.

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).

2. Определение содержания ГФР в крови из воротной вены

Определение содержания ГФР в крови из воротной вены через 2 часа после реперфузии выполняется по аналогичной технологии, описанной выше для МВБ-1а (часть I, пункт 1).

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

3.1. на этапе операции back-table (биопсия № 1), а также через 2 часа после реперфузии во время трансплантации печени (биопсия № 2) выполняется биопсия из 2го сегмента трансплантата печени (участок паренхимы размером 10x10 мм);

3.2. исследуемый материал фиксируется в 10%-ном нейтральном буферизованном формалине в течение 24 часов;

3.3. 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;

3.4. материал заливается в парафин;

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

3.6. стекла с адгезированными срезами депарафинируются последовательно в трех сменах ортоксилыла «ЧДА» по 5 мин, в двух сменах

спирта этилового 96° по 3 мин, одной смене спирта этилового 80° 3 мин, двух смена спирта этилового 70° по 3 мин при комнатной температуре;

3.7. демаскировка антигенов (высокотемпературная предобработка) проводится с использованием:

а. CD68 – водяной бани при температуре 97°С в течении 40 мин (цитратный демаскировочный буфер рН 6.0);

б. HMGB1 – микроволновой печи при температуре 99°С в течении 28 мин (демаскировочный буфер Tris/EDTA рН 6.1), после чего стекла промываются и помещаются во влажную камеру;

3.8. срезы обрабатываются 3%-ной перекисью водорода для блокировки эндогенной пероксидазы в течение 10 минут;

3.9. инкубация с первичными антителами проводится согласно протоколам каждого антитела (Таблица 1);

3.10. инкубация с использованием специализированной детекционной системы, время инкубации 30 мин. при комнатной температуре;

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

3.12. контрастирование ядер осуществляется гематоксилином Майера, затем срезы обезвоживаются в спиртах восходящей концентрации и заключаются в монтирующую среду на основе полистирола;

Таблица 1. - 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	Thermo	1:100	30 мин. при комнатной

Anti-HMGB1	Scientific		температуре
-------------------	------------	--	-------------

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

4. 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 часа после реперфузии и 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 часа после реперфузии, и 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 выполнения 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 часа 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 свидетельствует о низком риске развития ранней дисфункции трансплантата печени.

5. Управленческие решения.

При выявлении высокого риска развития ранней дисфункции трансплантата будет применяться «Метод предотвращения ишемически-реперфузионного повреждения и улучшения послеоперационной функции маргинального трансплантата печени» (регистрационный номер 087-0813). При выявлении низкого риска развития ранней дисфункции трансплантата печени будет использоваться клинический протокол клинический протокол трансплантации печени (глава 4, приложение 6 к приказу № 6 министерства здравоохранения Республики Беларусь от 05 января 2010г).