

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель Министра
Пиневиц Д.Л.
12 2015г.
Регистрационный № 180-115

**МЕТОД ОЦЕНКИ ЦЕЛОСТНОСТИ СОСУДИСТОГО ЭНДОТЕЛИЯ В
ОСТРОМ ПЕРИОДЕ ЛАКУНАРНЫХ ИНФАРКТОВ МОЗГА**

Инструкция по применению

Учреждения-разработчики: Государственное учреждение
«Республиканский научно-практический центр неврологии и нейрохирургии»;
Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр
трансфизиологии и медицинских биотехнологий»

Авторы: к. м. н. Анацкая Л.Н., д.м.н., профессор Хулуп Г.Я.; Гончарова
Н.В.; Северин И.Н.; Марченко С.В.

Минск, 2015

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкции) изложен метод оценки целостности эндотелия на основании определения баланса маркеров деструкции и репарации сосудистого эндотелия в остром периоде лакунарных инфарктов мозга (ЛИМ) при церебральной микроангиопатии (ЦМА).

Метод, изложенный в настоящей инструкции, предназначен для врачей-неврологов, врачей лабораторной диагностики.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

1. Оценка целостности и репаративной функции эндотелия церебрального микроциркуляторного русла в острейшем периоде лакунарных инфарктов мозга при церебральной микроангиопатии с целью оптимизации проводимого лечения в острейшем периоде лакунарных инфарктов мозга при церебральной микроангиопатии.

2. Оценка эффективности проводимой эндотелиопротективной и ангиогенной терапии в острейшем периоде лакунарных инфарктов мозга при церебральной микроангиопатии.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Противопоказаний для использования метода нет.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ, РЕАКТИВОВ, И ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Средства измерений

1. Проточный лазерный цитофлуориметр.

Вспомогательные устройства

1. Дозаторы переменного объема с диапазоном 0,2-1000 мкл.

2. Миницентрифуга-вортекс.

3. Центрифуга ОПн-3, оснащенная бакет-ротатором.

Ламинарный шкаф II класса защиты.

4. CO₂-инкубатор.

5. Инвертированный микроскоп.

Реагенты и расходные материалы

1. Пробирки, совместимые с проточным цитофлуориметром.
2. Наконечники для дозаторов переменного объема.
3. Рабочие растворы для обеспечения работы проточного цитофлуориметра.
4. Калибровочные частицы для настройки корректной работы проточного цитофлуориметра в соответствии с рекомендациями производителя.
5. Лизирующий раствор: 0,17 М хлорид аммония, 9,4 мМ гидрокарбонат калия, 0,09 мМ $K_3ЭДТА$ и 15 мМ азид натрия (рН $7,2\pm 0,1$).
6. Инкубационный раствор: 0,01 М фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБ), содержащий 0,15 М хлористого натрия, 1% бычьего сывороточного альбумина (БСА) и 15 мМ азид натрия (рН $7,2\pm 0,1$).
7. Отмывочный раствор: 0,01 М фосфатно-солевой буферный раствор, содержащий 0,15 М хлористого натрия, 0,5% бычьего сывороточного альбумина и 15 мМ азид натрия (рН $7,2\pm 0,1$).
8. Фиксирующий раствор: 1% раствор параформальдегида на фосфатно – солевом буферном растворе (рН $7,2\pm 0,1$).
9. Изотипический контроль, соответствующий изотипу применяемых моноклональных антител (МКА).
10. Антиген-специфичные моноклональные антитела, меченные флуорохромами, к антигенам клеток человека CD34, CD31, VEGFR-2 (KDR), VEGFR-1 (FLT1), CD133, CD117, CD144.

Допускается использование аналогичного оборудования, материалов и реактивов, по качественным характеристикам не уступающим указанным выше, разрешенных Министерством здравоохранения для применения на территории Республики Беларусь.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Метод оценки целостности эндотелия на основании определения баланса маркеров деструкции и репарации сосудистого эндотелия в первые 48 часов ЛИМ при ЦМА по отношению уровня циркулирующих эндотелиальных клеток (ЦЭК) с фенотипом CD31⁺CD144⁺ к сумме циркулирующих ранних ЭКП CD34⁺ с фенотипом CD133⁺, VEGFR-2⁺, CD117⁺ в процентах или абсолютных числах в первые 48 часов от начала ЛИМ при ЦМА с использованием методов проточной иммуноцитометрии на лазерном проточном цитофлуориметре.

Образцы свежезаготовленной венозной крови пациентов в первые 48 ч ЛИМ при ЦМА стабилизируют гепарином (20 ед/мл крови).

Для идентификации ЭКП в образцы вносят поверхностные антиген-специфичные моноклональные антитела (МКА) к CD31, VEGFR-2 (KDR), VEGFR-1 (FLT1), CD34, CD133⁺, CD117, CD144, меченные флуорохромами в различных комбинациях и инкубируют в соответствии с инструкцией производителя. В качестве контроля аутофлуоресценции применяют неокрашенные образцы клеток периферической крови, для изотипического контроля - подкласс иммуноглобулинов, соответствующий подклассу используемых МКА. В целях коррекции неспецифического связывания в образцы МПК вносят реагенты для блока Fc-рецепторов. После инкубации образцов эритроциты удаляют путем лизиса соответствующим раствором с последующей двукратной отмывкой фосфатно-солевым раствором (PBS, pH 7,2±0,1), содержащим 0,5% БСА. Для хранения образцов свыше 2-х часов вносят холодный (+4⁰C) фиксирующий раствор. Учитывают результаты на проточном цитофлуориметре не позднее 24 часов после фиксации клеток.

Аналитическую цитометрию проводят на лазерном проточном цитофлуориметре. Проточный цитометр калибруют в соответствии с инструкцией изготовителя, используя нагруженные флуорохромом микробусы и программы рабочей настройки оборудования для установки РМТ-вольтажа, флуоресцентной компенсации, а также для контроля

инструментальной чувствительности, наиболее оптимальной для использования. Для возбуждения флуоресценции используют 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, производится с использованием программного обеспечения проточного цитофлуориметра. Популяции ЭКП оцениваются после выделения логического «гейта» в DotPlot 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 100 000 клеток.

При увеличении отношения уровня ЦЭК с фенотипом CD133⁻CD34^{+/-}CD31⁺VEGFR-2⁺CD144⁺vWF⁺ к уровню ранних ЭКП с фенотипом CD133⁺CD34⁺VEGFR-2⁺CD144⁻vWF⁻ и СЭК CD117⁺ в процентах или абсолютных числах в 1,5 раза в сравнении с данными этого соотношения у здоровых доноров ($1,78 \pm 0,30$) в сторону деструкции эндотелия позволяет выявить нарушение целостности эндотелия артериального микроциркуляторного русла и его репаративной дисфункции в виде ослабления постинсультного ангиогенеза в ответ на острую церебральную ишемию. Диагностика дисбаланса между выраженностью деструкции эндотелия и его репарацией, свидетельствующего о смещении гомеостатического баланса в сторону преобладания процессов дегенерации эндотелия в первые 48 ч ЛИМ при ЦМА позволяет своевременно обосновать необходимость фармакологической эндотелиопротективной и ангиогенной терапии с использованием методов квантовой терапии для ранней вторичной профилактики ЛИМ при ЦМА; предупреждения таких осложнений как постинсультная деменция и сосудистый паркинсонизм, оценить эффективность проводимого лечения и профилактических мероприятий по модификации образа жизни.

ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ И ОСЛОЖНЕНИЯ

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