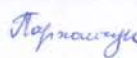


Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Красноярский государственный медицинский
университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства
здравоохранения Российской Федерации

Фармацевтический колледж

ДИПЛОМНАЯ РАБОТА

Тема: Методы иммунофенотипирования в трансплантологии
по специальности 31.02.03 Лабораторная диагностика

Выполнил: Пархомчук Анастасия Андреевна 

Руководитель: Букатова Елена Николаевна 

Рецензент: Пругова Вероника Леонидовна 
зав. клинико-диагностической лабораторией КГБУЗ ККБ

Работа допущена к защите ЦМК «Лабораторных и санитарно-гигиенических
дисциплин»

Протокол № 9 от «28» мая 2018 г

Красноярск 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
ГЛАВА 1. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДОВ ИММУНОФЕНОТИПИРОВАНИЯ.....	6
1.1 Правовые аспекты пересадки органов в РФ	6
1.2 Особенности преаналитического этапа при трансплантации.....	7
1.3 Метод проточной цитометрии	9
1.4 Серологический метод	11
1.5 Виртуальный метод (твердофазный иммуноанализ).....	13
1.6 Преимущества и недостатки методов ИФТ	14
ГЛАВА 2 - ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ	16
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	20
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	21
ПРИЛОЖЕНИЕ А – Поверхностные маркеры Т и В-лимфоцитов	23
ПРИЛОЖЕНИЕ Б - Типы меток и их особенности	26
ПРИЛОЖЕНИЕ В – Анализатор Luminex 200 в КГБУЗ ККБ.....	27

ВВЕДЕНИЕ

Трансплантология в медицине появилась относительно недавно и на сегодняшний день она активно развивается. Основоположником трансплантологии является русский ученый Владимир Петрович Демихов, который в 1937 году первый сконструировал искусственное сердце и вживил его собаке. С этим сердцем собака прожила около двух часов и это дало «старт» для дальнейшего развития трансплантологии. После этого было проведено еще множество экспериментов, благодаря которым сегодня трансплантация жизненно важных органов спасает тысячи людей.

Самая распространенная трансплантация в нашей стране – пересадка почки (ежегодная потребность в трансплантации почки составляет 7 150 пересадок в год) *(По данным доклада заведующей КДЛ КГБУЗ ККБ В.Л. Пруговой.В.Л.)* Красноярском крае пересаживать органы начали в 2014 году. В октябре 2016 года впервые была проведена успешная операция по пересадке родственной почки (больному сыну от матери), а в ноябре этого же года провели трансплантацию сердца и печени.

Для успешной трансплантации нужно найти подходящего донора для реципиента. Главным критерием при пересадке является гистосовместимость. Гистосовместимость - это комплекс человеческих лейкоцитарных антигенов (HLA), который обеспечивает представление антигенов чужеродных агентов, попадающих в организм. Антигены гистосовместимости — это гликопротеины, существующие на поверхности всех клеток. Первоначально были определены как главные антигены-мишени в реакциях на трансплантат. Гены HLA локализуются в 6-й хромосоме. Выделяют два основных класса этих антигенов: I класс располагается на поверхности всех типов клеток, кроме эритроцитов и клеток трофобласта, II класс на иммунокомпетентных клетках (В-лимфоциты), антигенпрезентирующих клетках (макрофаги, дендритные клетки), а также выявляются на эпидермальных, эндотелиальных клетках и сперматозоидах. Подбор гистосовместимости у донора проводят по 5 локусам (1 класс HLA A,

В, С; 2 класс HLA DR, DQ), у реципиента по 3 локусам (I класс- HLA A, HLA B; II класс- HLA DR).

Антигены, которые экспрессируют на своей поверхности клетки иммунной системы имеют особые молекулы, называемые маркерами. Значительная часть этих маркеров легко идентифицируется с помощью моноклональных антител. Моноклональные антитела — это антитела, которые принадлежат одному клеточному клону, то есть передаются от клетки-предшественницы.

Для этих маркеров в 1982 году была разработана система CD (Кластер дифференцировки), в которой маркерные молекулы, распознаваемые антителами, объединяют в одну группу и присваивают определенный номер (ПРИЛОЖЕНИЕ А). Чтобы обнаружить данные маркеры в иммунодиагностике широко используется иммунофенотипирование (ИФТ).

Актуальность данной темы в том, что при помощи иммунофенотипирования осуществляется подбор донора к реципиенту и оценка функционального состояния иммунной системы (отслеживание медленно восстанавливающихся лимфоцитов, определение типа и стадии дифференцировки, выявление процесса отторжения органа или ткани).

После трансплантации очень важно осуществлять контроль иммунной системы, так как от этого зависит сколько орган прослужит, его дальнейшее функционирование, а также какого будет общее состояние организма.

Помимо трансплантологии, иммунофенотипирование широко используется при диагностике ряда злокачественных, инфекционных заболеваний, а также в гематологии для определения лейкозов и лимфом.

Цель: Изучение методов иммунофенотипирования в трансплантологии.

Задачи:

- 1) Изучить правовые аспекты и регламентирующие документы по трансплантации органов в Российской Федерации.
- 2) Ознакомиться с методами ИФТ и дать сравнительную характеристику.
- 3) Принять участие в проведении метода иммунофенотипирования.

4) Проанализировать статистические данные.

Предмет исследования: методы иммунофенотипирования

Объект: донор и реципиент

База практики: КГБУЗ ККБ Краевая клиническая больница

Методы исследования:

- теоретический анализ и обобщение научной литературы;
- наблюдение;
- анализ статистики;
- выкопировка данных.

Структурно работа состоит из введения, двух глав и заключения. Во введении отображена актуальность данной темы, а также цели и задачи исследования. В первой главе представлены правовые аспекты трансплантации в РФ, теоретические основы иммунофенотипирования, стандартизация и виды его методов. Во второй части представлена практическая часть работы в ходе практики в КГБУЗ ККБ. В заключении дипломной работы были сделаны основные выводы по работе, раскрывающие задачи.

ГЛАВА 1. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДОВ ИММУНОФЕНОТИПИРОВАНИЯ

1.1 Правовые аспекты пересадки органов в РФ

В нашей стране деятельность службы трансплантации регламентируется следующими документами:

- «Основами законодательства РФ об охране здоровья граждан»;
- Федеральным законом Российской Федерации «О трансплантации органов и (или) тканей человека» №4180-1 от 22.12.1992(ред. 23.05.2016);
- Приказом Минздрава России №908н от 25.12.2014 "О Порядке установления смерти мозга человека"
- «Инструкцией по определению критериев и порядка определения момента смерти человека, прекращения реанимационных мероприятий», введенной приказом МЗ № 73 от 4.03.2003.

Основные положения ФЗ «О трансплантации органов и (или) тканей человека» №4180-1 от 22.12.1992:

1. Трансплантация (пересадка) органов и (или) тканей человека является средством спасения жизни и восстановления здоровья граждан и должна осуществляться на основе соблюдения законодательства Российской Федерации и прав человека в соответствии с гуманными принципами, провозглашенными международным сообществом, при этом интересы человека должны превалировать над интересами общества или науки.

2. Трансплантация органов и (или) тканей от живого донора или трупа может быть применена только в случае, если другие медицинские средства не могут гарантировать сохранения жизни больного (реципиента) либо восстановления его здоровья.

3. Изъятие органов и (или) тканей у живого донора допустимо только в случае, если его здоровью по заключению консилиума врачей-специалистов не будет причинен значительный вред.

4. Трансплантация органов и (или) тканей допускается исключительно с согласия живого донора и, как правило, с согласия реципиента. Органы и

(или) ткани человека не могут быть предметом купли-продажи. Купля-продажа органов и (или) тканей человека влечет уголовную ответственность в соответствии с законодательством Российской Федерации.

5. Объектами трансплантации могут быть сердце, легкое, почка, печень, костный мозг и другие органы и (или) ткани, перечень которых определяется Министерством здравоохранения Российской Федерации совместно с Российской академией медицинских наук.

6. Действие настоящего Закона не распространяется на органы, их части и ткани, имеющие отношение к процессу воспроизводства человека, включающие в себя репродуктивные ткани (яйцеклетку, сперму, яичники, яички или эмбрионы), а также на кровь и ее компоненты.

7. Изъятие органов и (или) тканей для трансплантации не допускается у живого донора, не достигшего 18 лет (за исключением случаев пересадки костного мозга) либо признанного в установленном порядке недееспособным.

8. Изъятие органов и (или) тканей не допускается, если установлено, что они принадлежат лицу, страдающему болезнью, представляющей опасность для жизни и здоровья реципиента.

1.2 Особенности преаналитического этапа при трансплантации

Для получения качественного и достоверного результата в диагностике большую роль играет преаналитический этап исследования. Показатели во многом зависят от факторов, влияющих на количество популяции лейкоцитов периферической крови. Они подразделяются на устранимые и неустранимые. К неустрашимым факторам относят возраст, климат, циркадные ритмы. К факторам, которые можно устранить, относят прием пищи, лекарственных препаратов, голодание, физические нагрузки, стресс, курение и многие другие. Все эти факторы нужно учитывать при исследованиях, так как при неправильной интерпретации результатов можно навредить пациенту, назначив некорректное лечение или профилактику.

Кровь для иммунологического анализа необходимо сдавать натощак с 8 до 10 часов утра и не ранее чем через 12 часов после последнего приема пищи. Взятие крови проводит медицинская сестра путем венопункции. Для исследования используются вакутейнеры с сиреневой крышкой с антикоагулянтом ЭДТА (при определении генотипа) и с красной крышкой (при определении антител). Взятый образец крови доставляется в лабораторию не позднее 2 часов после его получения, замедление доставки также может существенно повлиять на результат исследования. Транспортировка и хранение производится в вертикальном положении, при температуре +18-23С градуса, в специальных маркированных небьющихся контейнерах. Высокие температуры оказывают влияние на количество клеток венозной крови. В летний период при температуре +30-32С наблюдается дегрануляция гранулоцитов и, как следствие этого, значительное снижение их количества. Вместе с пробамы доставляется сопроводительный документ (направление на исследования), в котором описывается вся необходимая информация о пациенте.

Проводить исследование рекомендуется не позднее 6 часов после взятия образца, так как при более длительном хранении происходит слипание и агглютинация тромбоцитов и их прилипание к нейтрофилам.

Материал не может быть принят лабораторией в случае:

- отсутствия направления на исследование, маркировки;
- наличии сгустка, гемолиза;
- заморозки крови, хранение в холодильнике;
- при нарушении герметичности вакутейнера;
- нарушение правил транспортировки материала;
- несоблюдение сроков доставки.

Для генотипирования при трансплантации почки биоматериал у реципиентов забирают после гемодиализа (лечение острой и хронической почечной недостаточности с помощью аппарата «искусственная почка»).

Для доноров существуют особые критерии. Прижизненное донорство в России осуществляется только в целях родственной трансплантации и в случаях, когда нет времени ждать донорский орган от совместимого

посмертного донора. В целях прижизненного донорства можно использовать только один парный орган (почку) или часть печени, кишечника. Пересадки сердца, легких, поджелудочной железы возможны только от посмертного донора. Посмертный донор обязательно подвергается клиническому обследованию для комплексной оценки состояния всех органов, факторов риска, выявления противопоказаний к донорству и получения данных, необходимых для последующего использования при подборе реципиента. Само изъятие органов возможно только после констатации смерти (смерть мозга). Параллельно запускается процедура, предназначенная для сохранности органов и тканей, которую невозможно осуществлять без специального оборудования и высококвалифицированных специалистов. Органы пожилых и хронически больных людей не пригодны для пересадки.

Само ИФТ проводится в иммунологической лаборатории на специальных приборах – проточных цитофлуориметров или люминесцентных микроскопах. Принцип этих приборов заключается в нахождении особой флуоресцентной метки, располагающуюся на специфических антигенах. Вне зависимости от способа учета результатов (световая, люминесцентная, электронная микроскопия, проточная цитометрия) при иммунофенотипировании применяют моноклональные или поликлональные антитела, конъюгированные с меткой. В качестве метки используют различные вещества, особенности которых определяют способ их применения в соответствии с условиями задачи исследования: частицы коллоидного золота, радиоактивные вещества, флюорохромы, ферменты (ПРИЛОЖЕНИЕ Б).

На сегодняшний день в трансплантологии используются три метода:

- метод проточной цитометрии;
- серологический метод;
- виртуальный метод (твердофазный иммуноанализ).

1.3 Метод проточной цитометрии

На сегодняшний день этот метод широко используется в трансплантологии, для определения аллоантител к HLA (гистосовместимость) и соответствие числа CD34 у доноров и реципиентов. Также он распространен в трансфузионной медицине для определения комбинации лейкоцитов в продуктах крови, подсчет низкого уровня иммуноглобулинов (у пациентов с гемолизом) и фенотипирование эритроцитов после многочисленных трансфузий.

Принцип: Приготовленная суспензия из клеток, предварительно помеченных флуоресцирующими моноклональными антителами или флуорохромами, помещается в поток дисперсионной среды, пропускаемый через проточную ячейку. Данный метод позволяет разделить клетки на популяции, анализируя интенсивность сигналов исследуемых флуоресцентных маркеров.

Проводится на специальном приборе - проточном цитофлуориметре. Прибор включает в себя полупроводниковый лазер, который разделяет клетки посредством трех различных сигналов:

- Пряморассеянный свет – указывает на объем клетки (FSC);
- Боковой рассеянный свет – информирует о содержимом клетки, например, о ядрах и гранулах (SSC);
- Боковой флуоресцентный свет – указывает на количество ДНК, РНК в клетке (SFL).

Клетки со схожими свойствами формируют кластер на изображении, известном как диаграмма рассеивания. На диаграмме отображаются нормальные субпопуляции, а также клетки с отклонением от нормы.

Ход исследования:

1) Собрать, отмыть клетки и развести их в концентрации $1-5 \times 10^6$ клеток/мл в холодном фосфатно-солевом буфере (с добавлением 10% FCS, 1% азида натрия). Работать с клетками следует при температуре 4°C , используя охлажденные реактивы и в присутствии азида натрия для предотвращения модуляции и интернализации поверхностных антигенов.

2) Добавить 0.1-10 мг/мл первичных антител, конъюгированных с флуорохромами. При необходимости разводить антитела можно в 3% растворе натрия-фосфатного буфера. Также можно добавить йодид пропидия для исключения мертвых клеток.

3) Инкубировать антитела как минимум 30 мин при комнатной температуре или при температуре 4°C (в зависимости от используемых антител).

4) Отмыть клетки 3 раза с помощью центрифугирования на 400g 5 мин и развести их в 500-1000 мкл холодного натрия-фосфатного буфера. Держать клетки необходимо в темноте на льду. Провести анализ клеток на проточной цитометре рекомендуется как можно быстрее после завершения окраски.

5) Настроить прибор, используя неокрашенные клетки и необходимые контроли.

6) Найти и гейтировать исследуемый образец на гистограмме FSC-A (прямое светорассеяние) против SSC-A (боковое светорассеяния)

7) Отделить синглеты на гистограмме SSC-H (высота сигнала бокового светорассеяния) против SSC-W (ширина сигнала бокового светорассеяния)

8) Разделить клетки интереса на отдельные популяции и проанализировать их в соответствии с интенсивностью флуоресценции исследуемых маркеров на соответствующих гистограммах FL1/FL2 и т.д.

1.4 Серологический метод

Этот метод основан на «комплементзависимой цитотоксичности». Цель исследования - выявить любые антитела, которые могут реагировать с антигенами HLA донора и вызвать сверхострое отторжение трансплантата. Применяют для определения HLA I класса.

Сыворотка реципиента для проведения пробы на индивидуальную совместимость должна быть получена не более чем за 1 месяц до исследования. Дополнительно можно исследовать более ранние пробы сыворотки - иногда это позволяет выявить антитела, которые присутствовали в сыворотке реципиента в

низком титре, а к моменту последнего забора крови исчезли. В этом случае обычно исследуют пробу сыворотки, содержащей наибольшее количество антител к разным антигенам HLA.

Метод заключается в следующем:

1) К сывороткам против разных антигенов HLA добавляют исследуемые лимфоциты. Исследуемую суспензию лимфоцитов смешивают и инкубируют с набором анти-HLA-антисывороток известной специфичности. Если антисыворотка содержит антитела к одному из HLA-антигенов, то они связываются с клеточной мембраной.

2) Затем добавляют комплемент и продолжают инкубировать. Клетки, несущие на мембране связанные антитела, будут разрушены при активации комплемента.

3) Затем к лимфоцитам добавляют краситель (эозин или трипановый синий). Краситель поглощается только мертвыми клетками, которые окрашиваются. Живые клетки отторгают краситель. Это позволяет установить HLA-антиген по антисыворотке, вызвавшей лизис.

В серологический метод входит лимфоцитотоксический тест (метод типирования антигенов HLA). С Т-лимфоцитами позволяет выявить антитела к антигенам HLA класса I. С В-лимфоцитами позволяет выявить антитела к антигенам HLA как класса I, так и класса II, поскольку В-лимфоциты несут на своей поверхности антигены обоих классов. Лимфоцитотоксический тест с В-лимфоцитами более информативен, чем с Т-лимфоцитами, поскольку на поверхности В-лимфоцитов больше антигенов класса I. Исследование часто проводится с разными разведениями сыворотки реципиента.

Положительный лимфоцитотоксический тест свидетельствует о высоком риске не только сверхострого, но и острого и хронического отторжения трансплантата. Острое отторжение обусловлено образованием антител, хроническое - появлением цитотоксических Т-лимфоцитов, направленных против антигенов донора.

1.5 Виртуальный метод (твердофазный иммуноанализ)

Этот метод представляет собой специальные наборы с растворенными молекулами HLA, связанные с твердой матрицей, которой является микротитрационный планшет или полистероловые микросферы. В состав микросфер интегрированы два флуорофора в различной концентрации. Определенное соотношение концентраций флуорофоров создает 100 возможных типов частиц, каждая из которых будет иметь свою собственную уникальную спектральную характеристику. Спектр частицы является ее индивидуальным «номером» и определяет ее тип (вариант). Тип частицы распознается прибором Lumineх200 в процессе измерения. На поверхности полистирола могут быть зафиксированы различного рода биологические молекулы – антитела, антигены или фрагменты олигонуклеотидных последовательностей.

Система Lumineх используется для HLA-генотипирования и определения антител к HLA-антигенам, а также для генотипирования антигенов эритроцитов и тромбоцитов.

Метод основан на выделении донорских лейкоцитов из цельной крови в градиенте плотности, с последующим нанесением поверхностных HLA-антигенов на микросферы. При добавлении сыворотки реципиента, потенциально содержащей HLA антитела к данному донору, происходит связывание антител с комплексом антиген-микросфера.

Основные виды исследований:

- HLA-генотипирование;
- Выявление HLA-антител;
- Определение специфичности HLA антител с расчетом PRA% (PRA означает вероятность перекрестной иммуноспецифической реакции с потенциальным донором, случайно выбранным из здоровой популяции.);
- Ранняя диагностика риска острого отторжения почки по высоко-специфическим маркерам из группы тимокинов: OPG, MIG, OP-10.

Панели Luminex предоставляют широкую серию результатов тестирования в течение 4 часов, делая эти тесты ценными в диагностике гуморального отторжения при рутинном предтрансплантационном и посттрансплантационном мониторинге, а также в оценке эффективности программ, направленных на снижение антител.

Один из важнейших анализов, проводимых на Luminex DSA-тест – выявление донор-специфических антител у реципиента (реакция CROSS-MATCH). Проводиться на предварительном этапе планирования трансплантации между лимфоцитами донора и сыворотками потенциальных реципиентов, а также при мониторинге антидонорских HLA-антител после трансплантации.

Проводится в 4 этапа:

- Получение лизата из лимфоцитов донора;
- Инкубация лизата с HLA-микросферами;
- Добавление сыворотки реципиента;
- Добавление конъюгата анти-IgG-PE.

Если в результате теста гибнет большое количество лимфоцитов донора, то это говорит о положительном результате кросс-матч теста и означает обнаружение антител против потенциального донорского органа и большую вероятность развития криза отторжения. Отрицательный кросс-матч означает отсутствие антител к органу, которое будет пересажено.

1.6 Преимущества и недостатки методов ИФТ

На сегодняшний день, с ростом автоматизации исследований, предпочтение отдается проточной цитометрии и твердофазному иммуноанализу, так как эти методы удовлетворяют трем главным характеристикам: специфичность, быстрота и безопасность.

Однако, эти современные и востребованные методы обладают высокой себестоимостью, что затрудняет их использование при низком финансировании учреждения.

Таблица 1 - Сравнительная характеристика методов ИФТ

Характеристика	Проточная цитометрия	Серологический метод	Виртуальный (твёрдофазный иммуноанализ)
Чувствительность	++	+	+++
Возможность автоматизации	+	-	+
Большое количество исследований	+	-	+++
Биологическая безопасность	+	-	++
Низкая себестоимость	-	+	-

ГЛАВА 2 - ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

В настоящее время трансплантации в Красноярске проводятся в 3 лечебных учреждениях:

1. КГБУЗ Краевая клиническая больница
2. Федеральный Сибирский научно-клинический центр, ФМБА России
3. Федеральный Центр Сердечно-Сосудистой Хирургии,

Я проходила практику в КГБУЗ Краевой клинической больнице, в ней используется твердофазный иммуноанализ для ИФТ.

В данном лечебном учреждении я ознакомилась с мультиплексным проточным анализатором Lumіex 200 (ПРИЛОЖЕНИЕ В). Этот анализатор обеспечивает быстрое получение воспроизводимых результатов с минимальными затратами времени и ресурсов (96 образцов за 40 минут, определение до 100 аналитов в 50 мкл). Он основан на технологии xMap – набор микросфер диаметром 5,6 мкм, которые являются носителями внутренних флуоресцентных веществ (репортеров) и обладающих свойством специфического взаимодействия с анализируемыми молекулами по принципу реакции антиген-антитело.

Области применения:

- иммунология: изучение иммунного статуса, иммунодефицита, анализ маркеров острой фазы воспалительных процессов;
 - эндокринология: анализ маркеров дисфункции эндокринной системы;
 - онкология: анализ онкомаркеров;
- научные исследования: маркеры апоптоза, ангиогенеза.

Мною были изучены статистические данные проведения трансплантаций в мире, в России и в КГБУЗ ККБ:



Рисунок 2 - Количество трансплантаций по всему миру за год [По данным доклада заведующей КДЛ КГБУЗ ККБ В.Л. Пруговой]

Потребность в пересадках почки – 50 трансплантаций на 1 млн человек населения. Общее количество трансплантаций покрывает около 10% потребности.

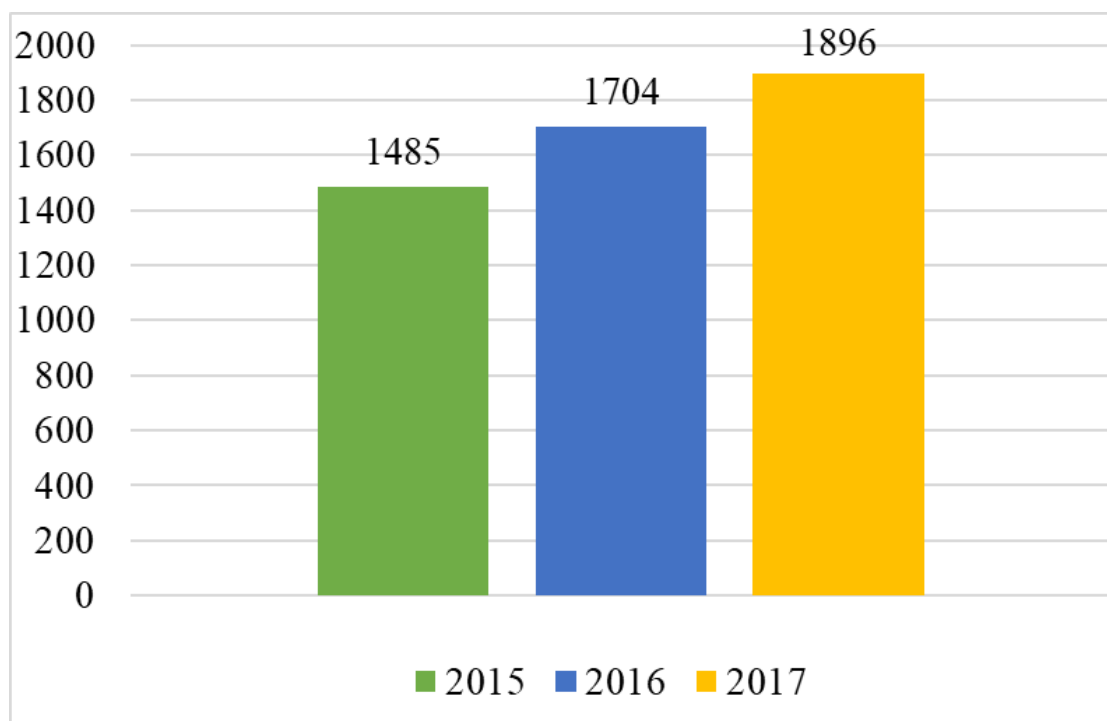


Рисунок 3 - Количество трансплантаций в России в период с 2015 по 2017 год [По данным доклада заведующей КДЛ КГБУЗ ККБ В.Л. Пруговой]

В период 2015 по 2017 год трансплантация в России увеличилась на 28%. Из расчета населения России (около 146 млн человек) ежегодная потребность в трансплантации почки составляет 7 150 пересадок в год. По данным «Вестника трансплантологии и искусственных органов», №3-2009 и №2-2015 г. (под редакцией Академика РАН С.В. Готье) потребность реализована на 14%.

В 2016 году заработала единая электронная система учета доноров, донорских органов и реципиентов. Учет ведется медицинскими организациями, включенными в перечень учреждений здравоохранения, осуществляющих забор, хранение и трансплантацию органов и тканей человека.

В 2013 году на базе КГБУЗ ККБ было организовано отделение органного донорства и отдел иммунофенотипирования в клинко-диагностической лаборатории. В декабре этого же года лечебное учреждение получила разрешение на проведение операций по трансплантации почки. До сих пор пересадка органа была доступна жителям Красноярского края лишь по федеральным квотам в клиниках Москвы, Новосибирска, Кемерово.

Таблица 2 – Количество трансплантаций в КГБУЗ ККБ в период с 2014 по 2017 год [По данным доклада заведующей КДЛ КГБУЗ ККБ В.Л. Пруговой]

Почки	43
Сердце	7
Печень	10
Обследовано реципиентов в лист ожидания	189



Рисунок 1 - Трансплантация почек в КГБУЗ ККБ в период с 2014 по 2017 годы

Из динамики проведения трансплантаций в России в период с 2015 по 2017 видно, что с каждым годом пересадка жизненно важных органов растет и все больше удовлетворяет потребность в трансплантации. В Красноярске, за счет трех учреждений, проводящих такие операции, наблюдается высокий уровень качества пересадок.

В КГБУЗ Краевой клинической больницы по мимо участия в ИФТ, на преддипломной практике я проводила следующие манипуляции:

Таблица 3 - Прохождение преддипломной практики в КГБУЗ ККБ

Манипуляции	Количество в день
Постановка СОЭ методом Панченкова	206
Забор капиллярной крови для определения глюкозы на анализаторе	46
Приготовление и окраска мазков крови	59
Определение LE-клеток методом Цинкхама—Конли	7
Работа на анализаторе XN-1000	233

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Правовые аспекты по трансплантации не совершенны и требуют внесения новых правил, которые бы позволяли предотвратить незаконный оборот донорских органов.

2. На сегодняшний день наиболее предпочтительным методом ИФТ является твердофазный иммуноанализ, так как он более чувствительный и обладает высокой производительностью (до 96 проб за день).

3. Проведение данного метода требует особой квалификации и подготовки специалиста. Прохождение практики в КГБУЗ ККБ позволило мне принять участие в проведении твердофазного иммуноанализа, как метода ИФТ, который исполняет врач клинической лабораторной диагностики.

4. Самой распространённой трансплантацией по всему миру является пересадка почки. На примере КГБУЗ ККБ видно, что трансплантации в нашем крае проводятся качественно, т. к. выявлен минимальный процент отторжений. Общее число трансплантаций по России возросло почти на 30%.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Федеральный закон Российской Федерации от 22.12.1992 «О трансплантации органов и (или) тканей человека» №4180-1, ред. 23.05.2016
2. Авдонкина Н.А. Иммунобиологические маркеры / Н.А. Авдонкина, Т.А. Славянская, И.А. Балдуева, С.В. Сальникова : Аллергология и иммунология, 2015. - 358 с.
3. Беклемишев, Н. Д Аллергология и клиническая иммунология / Беклемишев, Н. Д – М. : НИИ эпидемиологии, микробиологии и инфекционных болезней, 2014. - 134 с.
4. Бикбов, Б.Т. Состояние заместительной терапии больных с хронической почечной недостаточностью в Российской Федерации / Бикбов, Б.Т. – М. : Нефрология и диализ, 2011. - 150 с.
5. Боровкова, Н.В. Определение антилейкоцитарных донор специфических антител в раннем посттрансплантационном периоде / Н.В. Боровкова, Н.В. Доронина, Р.В. Сторожев, М.Ш. Хубутя, Л.В. Чудакова, Н.В. Шмарина : Молекулярная медицина, 2013. - 41 с.
6. Ватазин, А.В. Роль системы HLA в отторжении почечного трансплантата / А.В. Ватазин, А.Б. Зулькарнаев, Н.Г. Дмитриева, О.Н. Яковчик, В.А. Федулкина – М. : Альманах клинической медицины, 2013. - 79 с.
7. Данович, Г. М. Трансплантация почки / Г. М. Данович – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2013. - 67 с.
8. Дмитриева, Н. Г. Система гистосовместимости при трансплантации почки / Н. Г. Дмитриева – М. : Альманах клинической медицины, 2014 - 87 с.
9. Зурочка А. В. Стандартизация технологии иммунофенотипирования лимфоцитов методом проточной цитометрии / А. В. Зурочка, Н. М. Марачева, С. В. Хайдуков : Клиническая лабораторная диагностика, 2012. - 20 с.
10. Исаева Н. В. Интерпретация результатов иммунофенотипирования при диагностике лимфопролиферативного заболевания с учетом иммунофенотипического счета / Н. В. Исаева, Г. А. Зайцева, Т. П. Загоскина : Клиническая лабораторная диагностика, 2013. - 30-32 с.

11. Йегер Л. Клиническая иммунология и аллергология / Л. Йегер - М. : Медицина, 2013. - 526 с.
12. Камышникова, В.С. Методы клинических лабораторных исследований / В.С. Камышникова – М. : МЕДпресс-информ, 2018. - 599 с.
13. Литвинова Л. С. Основные поверхностные маркеры функциональной активности Т-лимфоцитов / Л. С. Литвинова : Медицинская иммунология, 2014 - 26 с.
14. Ройт, А. Иммунология / А. Ройт, Дж. Бростофф, Д. Мейл. - М. : Мир, 2011. - 593 с.
15. Серебровская, Л. В. Особенности преаналитического этапа для иммунофенотипирования клеток периферической крови / Л. В. Серебровская, Л. А Иванова, С. В. Хайдуков : Медицинская иммунология, 2014. - 646 с.
16. Семин Е. В. Система HLA: строение, функции, очевидная и возможная связь с аутоиммунными и атопическими заболеваниями / Е. В. Семин, Б. М. Блохин, К. Г. Каграманова : Лечебное дело, 2012. - 8 с.
17. Столяревич, Е.С. Морфологические особенности позднего отторжения трансплантированной почки и их прогностическое значение / Е.С. Столяревич, Л.Ю. Артюхина, И.Г. Ким : Вестник трансплантологии и искусственных органов, 2014. - 30 с.
18. Хайдуков С. В. Основные и малые популяции лимфоцитов периферической крови человека и их нормальные значения / С. В. Хайдуков, А. В. Зурочка, А. А. Тотолян, В. А. Черешнев : Медицинская иммунология, 2015. - 238 с.
19. Хайдуков, С. В. Подходы к стандартизации метода проточной цитометрии для иммунофенотипирования / С. В. Хайдуков – М : Медицинская иммунология – 2014. - 596 с.
20. Хубутя, М.Ш. Значение исследования антител к I и II классу HLA и МІСА при трансплантации почки / М.Ш. Хубутя, Н.В. Боровкова, Н.В. Доронина, А.В. Пинчук, И.В. Александрова : Вестник трансплантологии и искусственных органов, 2011. - 32 с.

ПРИЛОЖЕНИЕ А – Поверхностные маркеры Т и В-лимфоцитов

Антиген	Клетки, несущие маркер	Функции
Маркеры Т-лимфоцитов		
CD1	Т-лимфоциты коркового в-ва тимуса	Участвует в представлении антигена незрелым Т-лимфоцитам.
CD2	Т и NK-лимфоциты	Участвует в активации Т-лимфоцитов
CD3	Т-лимфоциты	Связан с антигенраспознающим рецептором Т-лимфоцитов, участвует в их активации.
CD4	Т-лимфоциты, моноциты	Присутствует на Т-хелперах, обеспечивает их взаимодействие с макрофагами.
CD5	Т- и В-лимфоциты	Присутствует на зрелых Т-лимфоцитах и незначительной части В-лимфоцитов, появляется на лейкозных В-лимфоцитах при хроническом лимфолейкозе.
CD7	Т-лимфоциты	Присутствует на костномозговых предшественниках Т-лимфоцитов и зрелых Т-лимфоцитах.
CD8	Т- и NK-лимфоцит	Присутствует на цитотоксических, Т-лимфоцитах, обеспечивает их взаимодействие с клетками-мишенями.
CD25	Т-, В- и NK-лимфоциты, моноцит	Маркер активированных Т- и В-лимфоцитов.
CD28	Т-лимфоциты	Участвует в активации Т-лимфоцитов.
CD29	Т-лимфоцит	Обеспечивает адгезию к внеклеточному матрикса.
CD38	Т- и В-лимфоциты	Присутствует на Т-лимфоцитах коркового

		вещества тимуса, активированных Т-лимфоцитах, незрелых В-лимфоцитах и плазматических клетках, участвует в регуляции функций В-лимфоцитов.
CD43	Т- и В-лимфоциты, гранулоциты, моноциты	Участвует в активации Т-лимфоцитов.
CD45	Все лейкоциты	Участвует в активации лимфоцитов, внутриклеточная часть рецептора является тирозинкиназой.
CD45RA	Все лейкоцит	Маркер девственных лимфоцитов CD4
CD45RO	Т- и В-лимфоциты, гранулоциты, моноциты	Маркер клеток памяти (лимфоцитов CD4)
CD71	Т-лимфоциты, моноциты	Рецептор трансферрина, маркер активированных Т-лимфоцитов.
Маркеры В-лимфоцитов		
Поверхностные иммуноглобулин	В-лимфоцит	Присутствуют только на зрелых В-лимфоцитах.
CD10	В-лимфоцит	Присутствует на незрелых В-лимфоцитах, появляется на лейкозных клетках при остром лимфолейкозе.
CD19	В-лимфоцит	Присутствует на пре-В-лимфоцитах и на всех зрелых В-лимфоцитах, участвует в активации В-лимфоцитов
CD20	В-лимфоцит	Присутствует на всех В-лимфоцита
CD21	В-лимфоцит	Рецептор к комплементу и вирусу Эпштейна-Барр
CD23	В- и Т-лимфоциты, моноциты, эозинофил	Низкоаффинный рецептор к Fc-фрагменту Ig
CD32	В-лимфоциты, гранулоциты	Низкоаффинный рецептор к Fc-фрагменту Ig.
CD40	В- лимфоцит	Стимулирует пролиферацию В-

		лимфоцитов, по строению сходен с CD27 и рецептором фактора некроза опухолей.
CD72	В-лимфоцит	Появляется на костномозговых предшественниках В-лимфоцитов, участвует в их дифференцировке.
HLA-DR	В- и Т-лимфоциты, моноциты	Антиген HLA класса II, участвует в представлении антигена Т-хелперам и их активации, маркер активированных Т-лимфоцитов.

ПРИЛОЖЕНИЕ Б - Типы меток и их особенности

Типы меток	Особенности практического использования	Качество визуализации антигенов клеток крови	Удобство практического применения
Флюорохромы	• Нестабильные препараты; • Необходимо специальное оборудование и помещение; • Затруднено сопоставление морфологией.	++	+/-
Фермент	Наличие эндогенных ферментов	++	++
Металлы и металлопротеины	• Высокая стоимость каждого исследования при относительно небольшом объеме информации; • Электронная микроскопия.	++	-
Радиозотопы	• Научные исследования; • Трудность обеспечения биологической безопасности.	++	-

