

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневиц

2020 г.



Регистрационный № 018-0320

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВЕРОЯТНОСТИ РАЗВИТИЯ
ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА У ПАЦИЕНТОВ С ЦИРРОЗОМ
ПЕЧЕНИ И ОСТРОЙ КРОВОПОТЕРЕЙ ТЯЖЕЛОЙ СТЕПЕНИ
ТЯЖЕСТИ ПОСРЕДСТВОМ ОЦЕНКИ ИНДЕКСА БЛЕББИНГА
КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ ЛИМФОЦИТОВ

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: учреждение образования

«Гомельский государственный медицинский университет»

АВТОРЫ: д.м.н., профессор Дундаров З.А., к.м.н., доцент Надыров Э.А.,
Евсеенко Д.А.

Гомель, 2020

Настоящая инструкция по применению (далее – инструкция) может быть использована в комплексе медицинских услуг, направленных на определение вероятности развития окислительного стресса (далее – ОС) у пациентов с циррозом печени и острой кровопотерей тяжелой степени тяжести (МКБ10 – K74.6; I85.0) посредством оценки индекса блеббинга клеточной стенки лимфоцитов.

Метод предназначен для врачей-хирургов, врачей-анестезиологов-реаниматологов, врачей лабораторной диагностики, иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с циррозом печени и острой кровопотерей тяжелой степени тяжести в амбулаторных и/или стационарных условиях, и/или в отделениях дневного пребывания учреждений здравоохранения Республики Беларусь.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ, ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ, РЕАКТИВОВ И Т.Д.

1. Пробирки вакуумные с жидким напылением ЭДТА КЗ объемом 5 мл.
2. Пробирки одноразовые пластиковые с крышкой объемом 10 мл, центрифужные градуированные.
3. Пипетки Пастера градуированные однократного применения из ПЭ, стерильные объемом 3 мл.
4. Штатив для пробирок объемом 10 мл, диаметр гнезда 18 мм.
5. Натрий-фосфатный буфер (PBS, pH 7,4).
6. Фиколл-верографин плотностью 1,075-1077 г/см³.
7. Высокоскоростная центрифуга (от 2000 до 8000 об./мин.) с ротором для пробирок типа одноразовых пластиковых с крышкой, центрифужных градуированных объемом 10 мл.

8. Дозатор одноканальный механический переменного объёма.
9. Одноразовые наконечники для дозаторов (универсально подходящих ко всем дозаторам) объёмом 5-200 мкл.
10. Микроцентрифуга-вортекс (от 1500 до 3000 об./мин.).
11. Чашки Петри пластиковые стерильные, диаметр 35 мм.
12. Микроскоп с насадкой для фазово-контрастной микроскопии.
13. Отдельный халат и одноразовые перчатки.
14. Емкость с дезинфицирующим раствором.
15. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Цирроз печени, осложненный острой кровопотерей тяжелой степени тяжести.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Метод, изложенный в данной инструкции, реализуется поэтапно.

1. Фракционирование лимфоцитарной взвеси.

1.1 Получение биологического материала (венозной крови) осуществляют из локтевой вены в вакуумную пробирку с ЭДТА в объёме 5 мл. После взятия кровь перемешивают, плавно переворачивая пробирку вверх дном. Неохлажденные пробы необходимо использовать в течение часа для последующего фракционирования лимфоцитарной взвеси или не более суток при хранении от +4°C до +8°C. Цельная кровь не подлежит заморозке.

- 1.2 В центрифужную пробирку объемом 10 мл (№1) при помощи пипетки Пастера вносят 5 мл венозной периферической крови из вакуумной пробирки, содержащей жидкое напыление ЭДТА.
- 1.3 Далее в пробирку №1 при помощи пипетки Пастера аккуратно, по стенке пробирки, добавляют натрий-фосфатный буфер в соотношении 1:1.
- 1.4 В центрифужную пробирку объемом 10 мл (№2) при помощи пипетки Пастера вносят фиколл-верографин объёмом 2 мл и аккуратно, по стенке пробирки, при помощи пипетки Пастера добавляют содержимое пробирки №1 в соотношении 1:2.

2. Центрифугирование.

- 2.1. Пробирку №2 помещают в центрифугу и выставляют параметры: скорость вращения 3000 оборотов/минута, ускорение, равное 400 G, 25 минут.
- 2.2. После окончания центрифугирования надосадочное «облако» лимфоцитов из пробирки №2 при помощи дозатора вносят в пробирку №3 и аккуратно, по стенке пробирки, добавляют натрий-фосфатный буфер при помощи пипетки Пастера доводя до объёма 10 мл.
- 2.3. Пробирку №3 помещают в центрифугу и выставляют параметры: скорость вращения 3000 оборотов/минута, ускорение, равное 400 G, 25 минут.
- 2.4. После окончания центрифугирования удаляют супернатант при помощи пипетки Пастера.
- 2.5. Полученную лимфоцитарную взвесь в пробирке при помощи микроцентрифуги-вортекс перемешивают в течение минуты.
- 2.6. Лимфоциты наносят дозатором на чашку Петри в количестве 30-40 мкл.

2.7. Осуществляют фазово-контрастную микроскопию полученной лимфоцитарной взвеси при увеличении микроскопа 600×.

3. Подсчет индекса блеббинга лимфоцитов (ИБЛ).

3.1. Подсчет ИБЛ осуществляется по следующей формуле:

$$\text{ИБЛ} = \frac{\text{Терминальный блеббинг лимфоцитов} \times 100}{\sum \text{блеббинг лимфоцитов}} \\ (\text{начальный блеббинг} + \text{терминальный блеббинг})$$

4. Интерпретация полученных результатов.

4.1. При пороговом значении индекса блеббинга лимфоцитов >15,8 у пациентов с циррозом печени и острой кровопотерей тяжелой степени тяжести можно определить вероятность развития ОС, который требует коррекции нарушений антиоксидантного статуса.

ВОЗМОЖНЫЕ ОСЛОЖНЕНИЯ И ОШИБКИ

Причиной ошибочных результатов при исследовании может быть нарушение правил взятия, хранения и транспортировки биологического материала, использование реактивов с истекшим сроком годности или неправильно хранившихся, загрязнение реагентов, погрешность пипетирования реагентов, неточно выставленные параметры центрифугирования.

Путь устранения – соблюдение правил организации и проведения исследования в клиничко-диагностической лаборатории.

ОБОСНОВАНИЕ ЦЕЛЕСООБРАЗНОСТИ ПРАКТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВЕРОЯТНОСТИ РАЗВИТИЯ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА У ПАЦИЕНТОВ С ЦИРРОЗОМ ПЕЧЕНИ И ОСТРОЙ КРОВОПОТЕРЕЙ ТЯЖЕЛОЙ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ ПОСРЕДСТВОМ ОЦЕНКИ ИНДЕКСА БЛЕББИНГА КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ ЛИМФОЦИТОВ

В настоящее время для определения вероятности развития окислительного стресса (ОС) в Республике Беларусь используется биохимический метод исследования [1,2,3].

Сыворотка крови здоровых лиц характеризуется антиоксидантной активностью (АОА), которая является средой для физиологического протекания ключевых биологических механизмом поддержания гомеостаза [4].

По мере прогрессирования цирроза печени (ЦП) согласно классификации Чайлд-Турко-Пью (С.G. Child 1963, J.G. Turcotte, 1963; R.N. Pugh, 1973), увеличения дефицита объёма циркулирующей крови вследствие острой кровопотери (ОК) тяжелой степени тяжести отмечено изменение АОА на прооксидантную активность (ПОА) сыворотки крови за счет свободнорадикального дисбаланса, который характеризуется высокими концентрациями активных форм кислорода (АФК).

АФК, являясь высокореактивными соединениями, вступают в активный метаболизм с бифосфолипидным слоем клеточной стенки лимфоцитов, что ведет к его реорганизации, формированию системного мембранодестабилизирующего синдрома и, как частный случай, блеббингу клеточной стенки лимфоцитов.

Блеббинг – обратимый динамический процесс частичной, либо полной дислокации бифосфолипидного слоя клеточной стенки от

цитоскелета лимфоцита вследствие взаимодействия с большим количеством АФК [5].

Указанное явление характеризуется нарушением функционального состояния клеток вплоть до развития синдрома полиорганной недостаточности (СПОН) [5,6]. Отмечено, что СПОН развивается у пациентов кровотечением тяжелой степени тяжести [7].

Интерпретация индекса блеббинга лимфоцитов (ИБЛ) пациентов с ЦП и ОК тяжелой степени тяжести, сыворотка крови которых характеризуется ПОА, позволяет оценить состояние антиоксидантного статуса (АОС) и, как следствие, вероятность развития ОС [5].

Предлагаемый метод диагностики – новый, альтернативный биохимическому методу исследования, морфологический метод определения вероятности развития ОС посредством оценки ИБЛ.

Настоящий метод посредством оценки ИБЛ имеет следующие преимущества:

- легко воспроизводим в клиничко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений, оснащенных микроскопом с насадкой для фазово-контрастной микроскопии;
- менее трудоемкий в исполнении в сравнении в биохимическим методом исследования;
- наряду с биохимическим методом исследования может быть использован в комплексной оценке степени эффективности проводимых лечебных мероприятий.

Таким образом, оценка ИБЛ периферической крови является новым морфологическим методом, позволяющим определить вероятность развития ОС у пациентов с ЦП и ОК тяжелой степени тяжести. Учитывая высокую информативность данного метода и его сопоставимость с биохимическим методом, техническую простоту, короткие сроки

выполнения – данная методика имеет реальные перспективы к широкому распространению в научных исследованиях и клинической практике.

Литература:

1. Грицук АИ, Сирота ТВ, Дравица ЛВ, Крэддок ЕА. Оценка состояния антиоксидантной активности слезной жидкости. Биомедицинская химия. 2006;52(6):601-08.
2. Патент №2144674. Российская Федерация. МПК7 G01N33/52, G01N33/68. Способ определения антиоксидантной активности супероксиддисмутазы и химических соединений. Заявитель и патентообладатель Сирота ТВ. №99103192/14; заявлено 24.02.1999; опубликовано 20.01.2000. Б.И.П.М. 2000;2: 266 с.
3. Зыблев СЛ, Петренко ТС, Зыблева СВ, Дундаров ЗА, Величко АВ. Развитие окислительного стресса при ишемически-реперфузионной травме. Хирургия. Восточная Европа. 2017;(1):8-14.
4. Зыблев СЛ, Дундаров ЗА. Антиоксидантная активность крови больных с острым гастродуоденальным кровотечением. Хирургия. Восточная Европа. 2013;1(05):13-23.
5. Евсеенко ДА, Дундаров ЗА, Надыров ЭА, Фомченко НЕ, Величко АВ. Блеббинг плазмолеммы лимфоцитов периферической крови как маркер окислительного стресса. Медико-биологические проблемы жизнедеятельности. 2019;2(22):30-35.
6. Власов АП, Трофимов ВА, Власова ТИ, Власов ПА, Мышкина НА. Системный мембранодестабилизирующий дистресс-синдром в хирургии: понятие, патогенез, диагностика. Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. 2019;(5):25-30.

7. Зыблев СЛ, Дундаров ЗА. Применение антиоксидантов при остром гастродуоденальном язвенном кровотечении. Новости хирургии. 2014;(22)2:155-163.