

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

**ОЦЕНКА РИСКА ОТТОРЖЕНИЯ АУТОДЕРМОТРАНСПЛАНТАТА  
ПО СОДЕРЖАНИЮ ПРОДУКТОВ ЛИПОПЕРОКСИДАЦИИ И  
ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА В ПЛАЗМЕ КРОВИ**

инструкция по применению

Гомель, 2010

УДК 616-089.844:616.15-07  
ББК 54.548:53.45  
Н 73

Авторы-разработчики:

*И.А. Новикова, Ю.И. Ярец, Л.Н. Рубанов*

Рецензенты:

кандидат медицинских наук, доцент  
заведующий центральной научно-исследовательской  
лабораторией БелМАПО, *И.В.Тарасюк*

кандидат биологических наук,  
руководитель научной группы «Иммунология»  
при лаборатории гемо- и лимфосорбции БГМУ, *О.В.Петракова*

Н 73 Оценка риска отторжения аутодермотрансплантата по содержанию продуктов липопероксидации и церулоплазмينا в плазме крови / авт.-разраб. И.А. Новикова, Ю.И. Ярец, Л.Н. Рубанов — Гомель: Учреждение образования «Гомельский государственный медицинский университет», 2010. — 15 с.

Инструкция предназначена для работы ожоговых, хирургических отделений, занимающихся аутодермопластикой, для больных локальными ранами различной этиологии и сроков давности (локальные глубокие ожоги, посттравматические и постнекротические раны, трофические язвы).

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель

Министра здравоохранения

Республики Беларусь

Р.А. Часнойть



2009 г.

Регистрационный номер  
№ 05-1-05.09.

**ОЦЕНКА РИСКА ОТТОРЖЕНИЯ АУТОДЕРМОТРАНСПЛАНТАТА  
ПО СОДЕРЖАНИЮ ПРОДУКТОВ ЛИПОПЕРОКСИДАЦИИ И  
ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА В ПЛАЗМЕ КРОВИ**  
(инструкция по применению)

**Учреждение-разработчик:**

УО «Гомельский государственный медицинский университет»

**Авторы:**

Доктор медицинских наук, профессор И.А. Новикова, Ю.И. Ярец, Л.Н. Рубанов.

Гомель 2009

## **Показания к применению**

Метод может быть использован в практике работы ожоговых, хирургических отделений, занимающихся аутодермопластикой, для больных локальными ранами различной этиологии и сроков давности (локальные глубокие ожоги, посттравматические и постнекротические раны, трофические язвы).

Основные цели метода:

1. Оценить готовность раны к аутотрансплантации на этапе планирования оперативного вмешательства (дополнительный объективный критерий).
2. Обосновать целесообразность дополнительного консервативного лечения на дооперационном этапе.
3. Оценить степень риска отторжения аутотрансплантата у конкретного пациента.
4. Лабораторный контроль стабильности аутотрансплантата.

Необходимым условием для применения метода является наличие визуальных клинических критериев готовности раны к оперативному восстановлению кожного покрова:

- отсутствие признаков воспаления;
- отсутствие выраженной экссудации;
- высокая адгезивность ран;
- наличие краевой эпителизации.

## **Противопоказания для применения:**

Противопоказаний нет. Однако предлагаемый метод не информативен в следующих случаях:

1. Обширные ожоги и раны, сопровождающиеся развитием ожоговой или травматической болезни;
2. сахарный диабет;

3. злокачественные новообразования;
4. тяжелая сердечно-сосудистая патология — ишемическая болезнь сердца, инфаркт миокарда, сердечно-сосудистая недостаточность;
5. ишемические и реперфузионные поражениях почек, головного мозга и других тканей;
6. тяжелая бронхолегочная патология (эмфизема, астма, острая и хроническая дыхательная недостаточность);
7. острые и хронические заболеваний печени (цирроз, гепатиты), почек (острая и хроническая почечная недостаточность);
8. острые инфекционные заболевания вирусной и бактериальной этиологии.

**Перечень необходимого оборудования, реагентов, вспомогательных устройств:**

1. Диагностические наборы для определения концентрации церулоплазмينا, стандартное оборудование клинико-диагностических лабораторий (центрифуга ОПн-3, ОПн – 8, термостат (диапазон термостатирования от 20 до 60°C), фотометр Solar, холодильник бытовой и др.). При невозможности автоматизированного определения допускается использование колориметрического метода Ravin H.A. (1961).

2. Для определения содержания продуктов перекисного окисления липидов необходимо следующее дополнительное оборудование и реактивы:

- 2.1. спектрофотометр СФ 46 «Ломо» (РФ);
- 2.2. изопропиловый спирт (квалификация не менее о.с.ч.);
- 2.3. гептан эталонный;
- 2.4. хлорид натрия (квалификация не менее ч.д.а.);
- 2.5. соляная кислота (квалификация не менее х.ч.);

## **Описание технологии использования метода с указанием этапов:**

Обследование проводят при планировании оперативного вмешательства на дооперационном этапе. У пациента путем венепункции с соблюдением стандартных правил преаналитического этапа забирают цельную кровь в количестве 5 - 7 мл с гепарином (из расчета 15-20 Ед гепарина на 1мл крови) из локтевой вены до планируемого оперативного вмешательства.

### **1. Определение содержания кетодиенов (КД) и оснований Шиффа (ОШ):**

#### **Подготовка исследуемого материала.**

1.1. В пробирки внести по 0,5 мл плазмы венозной крови.

1.2. В оптически е контроли внести 0,5 мл 0,9% раствора хлорида натрия.

### **2. Ход определения**

2.1. Добавить к исследуемому образцу 5 мл смеси гептан-изопропанол (1:1 по объему), для отдельной экстракции продуктов перекисного окисления липидов: в гептан экстрагируются нейтральные липопероксиды, в изопропанол – фосфолипидпероксиды.

2.2. Встряхивать пробы в закрытых пробирках в течение 15 мин.

2.3. Центрифугировать 15 мин при 8000 об/мин.

2.4. Слить липидные экстракты в стеклянные пробирки и добавить 5 мл смеси гептан-изопропанол 3:7 по объему.

2.5. Добавить к образцу 2 мл соляной кислоты рН 2,0.

2.6. Отстаивать в течение 30 мин.

2.7. Отобрать пипеткой гептановую фазу. Для анализа эта фаза не используется.

2.8. К оставшейся изопропанольной фазе липидного экстракта для обезвоживания добавить 1 г хлорида натрия.

2.9. Отстаивать в течение 30 мин.

2.10. Отобрать изопропанольную фазу в отдельную стеклянную пробирку. Эта фаза используется для анализа.

### **3. Идентификация результатов**

3.1. Провести измерение оптической плотности изопропанольной фазы на спектрофотометре против соответствующего контроля при 220, 278 и 400 нм.

3.3. Концентрацию КД, ОШ для изопропанольной фазы определить по формуле в единицах индексов окисления (е.и.о.):

$$\text{КД (е.и.о.)} = E278/220, \text{ ОШ (е.и.о.)} = E400/E220$$

где E220, E278, E400 – оптические плотности изопропанольной фазы экстракции образца плазмы при 220, 278, 400 нм соответственно.

### **2. Определение содержания церулоплазмина (ЦП):**

Проводится в соответствии с инструкцией к диагностическому набору.

### **3. Интерпретация результатов.**

При значениях ОШ менее 0,05 е.и.о., КД менее 0,350 е.и.о. и ЦП менее 350 мг/л прогнозируется послеоперационный лизис аутодермотрансплантата с вероятностью 94%. При значениях ОШ более 0,05 е.и.о., КД более 0,350 е.и.о. и ЦП более 350 мг/л прогнозируется благоприятный исход аутодермопластики с полным приживлением пересаженного кожного лоскута с вероятностью 92%.

Для использования показателей с целью лабораторного контроля стабильности аутодермотрансплантата необходимо определять содержание КД, ОШ, и ЦП на 3-4 и 7-9 дни послеоперационного периода. В случае благоприятного течения послеоперационного периода на 3-4

сутки происходит постепенное снижение содержания ОШ, КД и увеличение ЦП в плазме. На 7-9 сутки после операции характерна полная нормализация ОШ, остальные показатели при благоприятном исходе приближаются к значениям здоровых лиц.

При угрозе лизиса кожного аутотрансплантата на 3-4 сутки происходит дальнейшее увеличение концентрации ОШ, а содержание ЦП и КД остается в целом на уровне дооперационных значений.

**Перечень возможных осложнений и ошибок при выполнении и пути их устранения. Контроль качества метода. Техника безопасности.**

Осложнений нет. Ошибки могут быть связаны с нарушением технологии выполнения анализа.

**Пути устранения:**

1. Соблюдение требований преаналитического этапа, последовательности операций и аккуратное выполнение анализа является обязательным.

2. Использование реагентов с истекшим сроком годности запрещено.

Образцы плазмы для определения содержания продуктов перекисного окисления липидов необходимо исследовать только свежими в течение не более 2 часов от момента взятия крови. Исследуемые образцы плазмы для определения концентрации ЦП могут храниться при температуре +4°C в течение 3 дней; возможно хранение в замороженном виде при температуре -20 °C до 4 недель. Образцы должны быть без липемии и гемолиза.

Контроль качества проводимых лабораторных исследований осуществляется согласно приказу Министерства здравоохранения Республики Беларусь № 873 от 10.09.2009 г. «Об утверждении инструкций по контролю качества клинических лабораторных исследований».

При выполнении исследований необходимо соблюдать меры безопасности согласно действующим приказам Министерства



здравоохранения Республики Беларусь, инструкциям по охране труда для КДЛ и инструкциям по эксплуатации медицинских измерительных приборов, разработанных и утвержденных в учреждениях.

### Хронометраж метода определения концентрации КД и ОШ

№ пп	Содержание работ	Время, мин	
		единичное	каждое последующее
1	Подготовка реактивов к проведению анализа	5	1
2	Внесение контрольного, исследуемых образцов в пробирки	1	0,5
3	Встряхивание ручное	15	15
4	Центрифугирование	15	3
5	Сливание экстрактов в пробирку	1	0,5
6	Внесение к контрольному и исследуемым образцам смеси гептан-изопропанол	1	0,5
7	Внесение к контрольному и исследуемому образцам соляной кислоты	1	0,5
8	Инкубация	30	30
9	Удаление гептановой фазы	1	0,5
10	Внесение к контрольному и исследуемому образцам хлорида натрия	1	0,5
11	Инкубация	30	30
12	Отбор изопропанольной фазы	1	0,5
13	Измерение образцов	0,5	0,5
14	Расчет концентрации	1	1
Всего		103,5	84

## **Обоснование целесообразности практического использования**

Важную роль в хирургическом лечении ран играет операция аутодермопластики. Одним из наиболее частых осложнений данной операции является лизис аутооттрансплантата, частота которого по данным различных авторов составляет от 10 до 30%. Лизис пересаженного кожного лоскута приводит не только к обнажению уже закрытых ран и потере трансплантатов, но и к увеличению раневой поверхности за счет донорских участков. Даже небольшой по площади лизис увеличивает сроки восстановления кожных покровов, так как требует проведения повторной операции или длительного консервативного лечения. Серьезной причиной неудач трансплантации аутологичной кожи является отсутствие объективных методов адекватной оценки готовности раны к операции, которая в настоящее время осуществляется лишь на основании клинической оценки состояния больного и визуальных признаках гранулирующей раны. Однако факторы, влияющие на исход аутодермопластики, многочисленны и разнообразны. Кроме чисто технических причин (недостаточная подготовка ран к операции, дефекты трансплантатов и их укладки и др.), важное значение имеет общее состояние реактивности организма на момент трансплантации.

Известно, что активные формы кислорода и продукты перекисного окисления липидов (ПОЛ) являются универсальными вторичными месенджерами, которые участвуют в передаче сигналов через клеточные мембраны, регулируют их проницаемость, активность рецепторов, и в целом осуществляют контроль метаболического статуса организма. Баланс про- и антиоксидантных систем обеспечивает оптимальную реактивность организма в ответ на различные травмирующие воздействия. Это указывает, что параметры системы ПОЛ/АОЗ могут отражать

готовность организма к оперативному вмешательству и служить прогностическими критериями оперативного лечения.

Нами ранее показано, что наличие локального раневого поражения сопровождается общей активацией процессов свободнорадикального окисления с накоплением первичных (ДК), вторичных (КД) и конечных продуктов пероксидации (ОШ) фосфолипидов и нейтральных жиров в периферической крови, а также одновременной стимуляцией системы антиоксидантной защиты - АОЗ (увеличение активности каталазы, супероксиддисмутазы и концентрации церулоплазмينا (ЦП)). Среди вышеперечисленных показателей наибольший размах изменений (от 50 до 400%) и наиболее четкая связь с состоянием пациентов и особенностями течения послеоперационного периода установлена для следующих параметров: содержание КД и ОШ в изопропанольной фазе плазмы, а также концентрация ЦП в плазме. Так, в динамике неосложненного послеоперационного периода наблюдалось постепенное снижение содержания ОШ, увеличение ЦП в плазме ( $p < 0,0001$  по сравнению с дооперационными значениями). На момент приживления аутодермотрансплантата (7-9 сутки после операции) отмечалась полная нормализация ОШ, остальные показатели приближались к значениям здоровых лиц.

Иная динамика этих показателей наблюдалась у больных с признаками лизиса кожного аутоотрансплантата. Происходило дальнейшее увеличение концентрации ОШ. При этом содержание ЦП оставалось на уровне дооперационных значений.

Ретроспективный анализ показал достоверные различия дооперационных значений концентрации КД, ОШ и ЦП в группах больных с хорошим исходом операции и с осложненным течением (лизис пересаженного лоскута,  $p < 0,001$ ,  $p < 0,0001$ ). Причем степень повышения

КД, ОШ и ЦП в дооперационном периоде коррелировала с благоприятным прогнозом операции аутодермопластики ( $r=0,51$ ,  $p=0,028$ ,  $r=0,55$ ,  $p<0,0001$ ,  $r=0,52$ ,  $p=0,002$  соответственно).

Таким образом, для прогноза и контроля репаративного процесса при операции аутодермопластики у больных с локальными ранами, кроме клинической оценки, целесообразно использование объективных лабораторных критериев – концентрации КД, ОШ и ЦП в плазме пациентов.

### Литература

1. Волчегорский, И.А. Сопоставление различных подходов к определению продуктов перекисного окисления липидов в гептан – изопропанольных экстрактах крови / И.А. Волчегорский // Вопросы мед. химии. Т. 35, – 1989. - № 1. – С. 127 – 135.
2. Камышников, В.С. // Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике / В.С. Камышников. – Мн., 2000. – В 2 Т.
3. Кудзоев, О.А. Принципы хирургического лечения больных с локальными глубокими ожогами / О.А. Кудзоев // Комбустиология [Электронный ресурс]. – 2001. - № 8-9. – режим доступа [http//. www.burn.ru](http://www.burn.ru).
4. Львовская, Е.И. Спектрофотометрическое определение конечных продуктов перекисного окисления липидов / Е.И. Львовская // Вопросы мед. химии. Т. 37, - 1991. - № 4. – С. 93.
5. Новикова, И.А. Состояние процессов свободнорадикального окисления и системы антиоксидантной защиты у больных с локальными глубокими ожогами на различных этапах оперативного лечения / И.А. Новикова, Ю.И. Ярец, Л.Н. Рубанов // Проблемы здоровья и экологии. – 2007. – Т.14, № 4. – С. 48 – 53.
6. Парамонов, Б.А. // Ожоги: руководство для врачей / Б.А. Парамонов. – СПб., 2000. – 480 с.
7. Худяков, В.В. Сравнительная оценка эффективности различных методов подготовки ожоговых ран к аутодермопластике / В.В. Худяков, М.Г. Крутиков // Комбустиология [Электронный ресурс]. – 2003. - № 16-17. – режим доступа [http//. www. www.burn.ru](http://www.burn.ru).
8. Шанин, Ю.И., // Антиоксидантная терапия в клинической практике (теоретическое обоснование и стратегия проведение) / Ю.И. Шанин В.Ю. Шанин, Е.В. Зиновьев. - СПб., 2003 — 128 с.

9. Юнкеров, В.И. // Математико – статистическая обработка данных медицинских исследований / В.И. Юнкеров, С.Г. Григорьев. – СПб.: ВМедА, 2002. – 266 с.
10. Davis J., Goadrich M. The Relationship Between Precision-Recall and ROC Curves // Proc. Of 23 International Conference on Machine Learning, Pittsburgh, PA, 2006

УТВЕРЖДАЮ

\_\_\_\_\_  
руководитель учреждения,  
в котором учреждён способ

« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 20\_\_ г.

### АКТ О ВНЕДРЕНИИ

1. Наименование предложения для внедрения (метод профилактики, диагностики, лечения, устройство, форма организационной работы)

Оценка риска отторжения аутодермотрансплантата по содержанию продуктов липопероксидации и церулоплазмينا в плазме крови

2. Кем и когда предложен (наименование учреждения, авторы) Гомельский государственный медицинский университет (И.А. Новикова, Ю.И. Ярец, Л.Н. Рубанов)

3. Источник информации (метод, рекомендации, отчет о НИР, съезды, конференции, семинары) \_\_\_\_\_

4. Где и когда внедрено (наименование учреждения, дата начала внедрения) \_\_\_\_\_

5. Результаты применения метода за период с \_\_\_\_\_ по \_\_\_\_\_.

положительные (кол-во наблюдений) \_\_\_\_\_

неопределенные (кол-во наблюдений) \_\_\_\_\_

отрицательные (кол-во наблюдений) \_\_\_\_\_

6. Эффективность внедрения

7. Заключение, предложения: \_\_\_\_\_

« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 200\_\_ г.

Ответственные за внедрение

\_\_\_\_\_  
(должность, ФИО)

\_\_\_\_\_  
(подпись)

Научное издание

**Новикова Ирина Александровна**

**Ярец Юлия Игоревна**

**Рубанов Леонид Николаевич**

**ОЦЕНКА РИСКА ОТТОРЖЕНИЯ АУТОДЕРМОТРАНСПЛАНТАТА ПО  
СОДЕРЖАНИЮ ПРОДУКТОВ ЛИПОПЕРОКСИДАЦИИ И  
ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА В ПЛАЗМЕ КРОВИ**

**Инструкция по применению**