

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Р.А. Часнойть
18 декабря 2009 г.
Регистрационный № 051-0509

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

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: УО «Гомельский государственный
медицинский университет»

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф. И.А. Новикова, Ю.И. Ярец, Л.Н. Рубанов

Гомель 2009

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, ПРЕПАРАТОВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Диагностические наборы для определения концентрации церулоплазмينا, стандартное оборудование клинико-диагностических лабораторий (центрифуга ОПн-3, ОПн-8, термостат (диапазон термостатирования от 20 до 60 °С), 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.).

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Метод может быть использован в практике работы ожоговых, хирургических отделений, выполняющих аутодермопластику; для больных с 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;
- краевая эпителизация.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Противопоказаний нет. Однако предлагаемый метод неинформативен 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 поражения почек, головного мозга и других тканей.
6. Тяжелая бронхолегочная патология (эмфизема, астма, острая и хроническая дыхательная недостаточность).
7. Острые и хронические заболевания печени (цирроз, гепатиты), почек (острая и хроническая почечная недостаточность).
8. Острые инфекционные заболевания вирусной и бактериальной этиологии.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СПОСОБА

Обследование проводят при планировании оперативного вмешательства на дооперационном этапе. Путем венепункции с соблюдением стандартных правил преаналитического этапа у пациента из локтевой вены забирают 5–7 мл цельной крови с гепарином (из расчета 15–20 Ед гепарина на 1 мл крови).

Определение содержания кетодиенов (КД) и оснований Шиффа (ОШ)

1. Подготовка исследуемого материала

- 1.1. В пробирки внести по 0,5 мл плазмы венозной крови.
- 1.2. В оптические контроли внести 0,5 мл 0,9%-го 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 в объемном соотношении 3:7.
- 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 она не используется).
- 2.8. Для обезвоживания к оставшейся изопропанольной фазе липидного экстракта добавить 1 г хлорида натрия.
- 2.9. Отстаивать в течение 30 мин.
- 2.10. Отобрать изопропанольную фазу для анализа в отдельную стеклянную пробирку.

3. Идентификация результатов

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

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

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

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

Определение содержания церулоплазмينا (ЦП)

Проводится в соответствии с инструкцией к диагностическому набору.

Интерпретация результатов

При значениях ОШ <0,05 е.и.о., КД <0,350 е.и.о. и ЦП <350 мг/л прогнозируется послеоперационный лизис аутодермотрансплантата с вероятностью 94%.

При значениях ОШ >0,05 е.и.о., КД >0,350 е.и.о. и ЦП >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-й и 7–9-й дни послеоперационного периода. В случае благоприятного течения послеоперационного периода на 3–4-е сут происходит постепенное снижение содержания ОШ, КД и увеличение ЦП в плазме крови. На 7–9-е сут после операции наблюдается полная нормализация ОШ, остальные показатели при благоприятном исходе приближаются к значениям здоровых лиц.

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

Хронометраж метода определения концентрации КД и ОШ

№ пп	Содержание работ	Время, мин	
		единичное	каждое последующее
1	Подготовка реактивов к анализу	5	1
2	Внесение контрольного и исследуемого образцов в пробирки	1	0,5
3	Ручное встряхивание	15	15
4	Центрифугирование	15	3
5	Сливание экстрактов в пробирку	1	0,5

6	Внесение к контрольному и исследуемому 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

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ 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. Обязательным является соблюдение требований преаналитического этапа, последовательности операций и аккуратное выполнение.

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 ч от момента взятия крови. Исследуемые образцы плазмы для определения концентрации ЦП могут храниться при температуре +4 °С в течение 3 дней; возможно хранение в замороженном виде при температуре -20 °С до 4 недель. Образцы должны быть без липемии и гемолиза.

Контроль качества лабораторных исследований осуществляется согласно приказу Министерства здравоохранения Республики Беларусь № 873 от 10.09.09 «Об утверждении инструкций по контролю качества клинических лабораторных исследований».

При исследовании 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 лечебных учреждениях.