

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ  
Первый заместитель министра

\_\_\_\_\_ Д.Л. Пиневич  
11.07.2014  
Регистрационный № 069-0714

**МЕТОД ДИАГНОСТИКИ ИНФИЦИРОВАННОГО ПАНКРЕОНЕКРОЗА  
ПО ДАННЫМ ОЦЕНКИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ЭНДОТЕЛИЯ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: УО «Витебский государственный медицинский университет»

АВТОРЫ: Д.М. Овсяник, д-р мед. наук, доц. А.В. Фомин

Витебск 2014

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) представлен метод диагностики инфицированного панкреонекроза по данным оценки функционального состояния эндотелия, применение которого позволяет повысить эффективность лечения пациентов с данной патологией.

Инструкция предназначена для врачей-хирургов и врачей-анестезиологов-реаниматологов учреждений здравоохранения хирургического профиля всех уровней.

## **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ**

1. Цитрат натрия.
2. Аденозиндифосфорная кислота (АДФ).
3. Метиленовый синий.
4. Весы лабораторные электронные.
5. Колбы стеклянные мерные.
6. Механический смеситель со смещенным центром.
7. Центрифуги лабораторные типа ОПн-3 и ОПн-8.
8. Пробирки конические центрифужные.
9. Пробирки пластиковые.
10. Микропипетки (№ 12).
11. Камера Горяева.
12. Микроскоп лабораторный.

## **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Панкреонекроз.

## **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ**

Противопоказаний к применению метода нет.

## **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА**

1. Приготовление исходных растворов реагентов: цитрат натрия — растворяют 3,8 г цитрата натрия в 100 мл дистиллированной воды (3,8% раствор), аденозиндифосфорная кислота (АДФ) — 1 мг АДФ растворяют в 1 мл дистиллированной воды (0,1% АДФ), метиленовый синий — растворяют 100 мг метиленового синего в 100 мл дистиллированной воды (0,1% раствор).

2. В пробирку, содержащую 0,5 мл 3,8% раствора цитрата натрия, добавляют 4,5 мл крови пациента с панкреонекрозом (соотношение 1:9), взятой во второй фазе течения заболевания (с 9–14-х сут от начала заболевания) путем пункции периферической вены, и тщательно перемешивают.

3. Определение количества циркулирующих эндотелиальных клеток в плазме крови проводят по методу Hladovec et al. и в соответствии с инструкцией по применению № 91-1004, утвержденной Министерством здравоохранения Республики Беларусь 25.06.2005.

3.1. Пробирку с кровью центрифугируют при 1000 об./мин 10 мин (200g).

3.2. В пластиковую пробирку переносят 1 мл полученной обогащенной тромбоцитами плазмы и добавляют 0,1 мл 0,1% АДФ.

3.3. Пробирку встряхивают в течение 10 мин при комнатной температуре на

механическом смесителе со смещенным центром, а затем центрифугируют при 2000 об./мин в течение 10 мин (480g).

3.4. Из полученной надосадочной жидкости (бедная тромбоцитами плазма) переносят 0,2 мл в пластиковую пробирку и добавляют две капли (40 мкл) 0,1% раствора метиленового синего. Через 5 мин проводят микроскопию полученного материала (200x) для выявления циркулирующих эндотелиальных клеток.

3.5. Подсчет циркулирующих эндотелиальных клеток (просматриваются как большие 35×50 мкм полигональные клетки) проводят во всем объеме камеры Горяева (10 мкл), начиная с ее верхнего левого угла. От одного пациента считают десять проб по 10 мкл плазмы (всего 100 мкл). Суммируют данные о количестве циркулирующих эндотелиальных клеток во всех десяти пробах и устанавливают их общее количество, которое выражается в единицах на 100 мкл плазмы.

4. На основании полученных результатов делают вывод о стерильности либо инфицированности панкреонекроза. При наличии в крови пациента с панкреонекрозом, взятой во второй фазе течения заболевания (с 9–14-х сут от начала заболевания), 39 и более циркулирующих эндотелиальных клеток в 100 мкл плазмы диагностируют инфицированный панкреонекроз.

#### **ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ**

1. Эндотелиальные клетки иногда образуют конгломераты из 2–3 и более клеток, что несколько затрудняет их выделение и подсчет. Необходимо определить границы каждой клетки, чтобы установить их точное количество.

2. На количество циркулирующих эндотелиальных клеток в крови может повлиять проведение плазмофереза, поэтому использование метода следует начинать не ранее 6 ч после данной процедуры.