

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ



МЕТОД ОЦЕНКИ РИСКА ИНФАРКТА МОЗГА

(инструкция по применению)

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

Учреждение образования «Гомельский государственный медицинский университет»

АВТОРЫ:

М.Н. Стародубцева, Н.В. Галиновская, Е.В. Воропаев,
О.А. Иванцов, Д.Р. Петренев, Е.А. Липская

Гомель, 2015

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневиц
11.12.2015
Регистрационный № 153-1115

МЕТОД ОЦЕНКИ РИСКА ИНФАРКТА МОЗГА

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: УО «Гомельский государственный медицинский университет»

АВТОРЫ: М.Н. Стародубцева, Н.В. Галиновская, канд. мед. наук, доц.
Е.В. Воропаев, О.А. Иванцов, Д.Р. Петренев, Е.А. Липская

Гомель 2015

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод оценки риска инфаркта мозга (ИМ) при проведении его вторичной профилактики в группе лиц с преходящими нарушениями мозгового кровообращения (ПНМК), включающей транзиторную ишемическую атаку и церебральный гипертонический криз (код МКБ-10 — G45). Вышеуказанная группа дополнительно подразделяется по уровню продукции активных форм азота (АФА), в данном случае монооксида азота (NO) и пероксинитрита в остром периоде ПНМК. Описанный в инструкции метод предназначен для применения в технологическом процессе спектрофотометрического определения концентрации стабильных метаболитов NO: нитрит- и нитрат-ионов (NO_x) в плазме крови, на основе которого осуществляется ранжирование пациентов с ПНМК. Методология исследования основана на различии в скорости продукции NO, определяемой по уровню NO_x , в клетках (в основном иммунной системы и эндотелия) в норме и при их активации в условиях патологического процесса, на фоне которого развивается ПНМК.

Инструкция предназначена для врачей-лаборантов, врачей-терапевтов и врачей-неврологов лечебно-диагностических стационаров различного профиля.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Лабораторное оборудование, применяемое для определения концентрации NO_x в плазме крови, представлено в таблице 1.

Таблица 1 — Оптимальный набор оборудования

Наименование оборудования и основные характеристики	Кол-во
Высокоскоростная термостатированная центрифуга (10000–15000×g) с ротором для пробирок типа «Eppendorf» объемом 1,5 мл, с диапазоном рабочих температур от 0 до +25°C	1
Твердотельный термостат с возможностью поддержания рабочей температуры от 0 до 100°C	1
Бытовая морозильная камера с возможностью поддержания рабочей температуры -20°C	1
Планшетный спектрофотометр, позволяющий проводить измерения на длинах волн 550–650 нм	1
Шкаф вытяжной лабораторный	1
Весы торсионные	1

Также необходимы следующие расходные материалы: микроцентрифужные пробирки на 1,5 мл; планшеты 96 луночные прозрачные; дозаторы пипеточные разных объемов; наконечники с фильтром разных объемов; халаты, резиновые перчатки, фильтровальная бумага, штативы для пробирок, стеклянная химическая посуда и др.

В таблице 2 приведен список реагентов для исследования.

Таблица 2 — Список реагентов, необходимых для проведения анализа

Наименование реагентов
Реактив Грисса, состоящий из двух равных частей: раствора I (0,1% раствор N-(1-нафтил)-этилендиамина в деионизированной воде) раствора II (0,35% раствор 4,4'-диаминодифенилсульфона в 2N соляной кислоте)
Хлорид ванадия III (VCl_3)
Раствор соляной кислоты 0,1N
Этанол 96%
Нитрат калия (10мМ раствор)

Для установления концентрации NO_x в плазме крови применяют метод исследования концентрации нитрит-ионов на основе реакции Грисса с образованием окрашенного продукта, количество которого определяют спектрофотометрически с помощью микропланшетного фотометра с использованием в качестве основной длины волны $\lambda = 550$ нм, в качестве референсной — $\lambda = 650$ нм. Нитрат-ионы предварительно восстанавливают в реакции с хлоридом ванадия III (VCl_3). Работа с растворами проводится в вытяжном шкафу в резиновых перчатках.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Преходящие нарушения мозгового кровообращения в остром периоде, включающие транзиторную ишемическую атаку и церебральный гипертонический криз (код МКБ-10 — G45).

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

1. Материал для исследования

Используется кровь из периферической (локтевой) вены. Забор крови производится утром натощак в пробирку, обработанную раствором этилендиамина. Полученный материал смешивается путем плавного переворачивания пробирки 4–5 раз и доставляется в лабораторию. Забор крови у одного пациента осуществляется дважды: при его поступлении в стационар на 1–2-е сут (или при первом после ПНМК амбулаторном обращении) и на 10-е сут острого периода ПНМК.

2. Выполнение измерений

Для определения концентрации NO_x в плазме крови используется метод с одновременным восстановлением нитрат-ионов до нитрит-ионов и установлением концентрации нитрит-ионов с помощью модифицированного реактива Грисса. Образцы плазмы крови объемом 300 мкл смешивают с 600 мкл этанола (96%) в полипропиленовых пробирках с крышкой типа Эппендорф (1,5 мл), инкубируют в течение 1 ч ($-20^{\circ}C$) и центрифугируют в течение 2 мин ($4^{\circ}C$, 14000 g). Затем 500 мкл супернатанта переносят в чистые пробирки и смешивают с 250 мкл

свежеприготовленного реактива Грисса, состоящего из 2 частей VCl_3 (8 г/л в 0,1M HCl), 1 части раствора I (0,1% раствор N-(1-нафтил)-этилендиамина в деионизированной воде) и 1 части раствора II (0,35% раствор 4,4'-диаминодифенилсульфона в 2N HCl). После этого образцы инкубируют в течение 30 мин ($37^{\circ}C$) с периодическим перемешиванием содержимого. Образцы снова центрифугируют в течение 2 мин ($4^{\circ}C$, 14000 g), 300 мкл супернатанта переносят в ячейки прозрачных 96-луночных планшетов. Оптическую плотность на длине волны 550 нм измеряют с помощью планшетного фотометра. Концентрацию NO_x определяют по калибровочной кривой, построенной по результатам измерения оптической плотности для водного раствора нитрита натрия с линейным участком в диапазоне концентраций 0,1–100,0 мкМ/л.

3. Заключение

Определение параметров распределения нитрит- и нитрат-ионов в плазме крови пациентов с ПНМК с помощью модифицированного реактива Грисса в динамике острого периода имеет важное прогностическое значение и может быть использовано для формирования групп адресной активной вторичной профилактики ИМ, нуждающихся в дополнительном контроле и лечебных мероприятиях по коррекции эндотелиальной дисфункции (код МКБ-10 — Z03 «Медицинское наблюдение и оценка при подозрении на заболевание или патологическое состояние»). В соответствии с выявленным нормальным диапазоном концентрации NO_x в плазме крови, граничным верхним значением которого является 33 мкМ, пациенты с ПНМК на 10-е сут острейшего периода заболевания в зависимости от динамики концентрации NO_x в плазме крови могут быть отнесены к одной из **четырёх групп риска по возникновению ИМ** для определения направления вторичной профилактики ИМ.

Группа низкого риска. Концентрация NO_x не превышает пороговых значений контроля, не увеличивается в течение острого периода и составляет при первом (1–2-е сут) и при повторном измерении (10-е сут) <33 мкМ.

Мероприятия в группе. Динамическое наблюдение, выполнение мероприятий по вторичной профилактике ИМ согласно приказу Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 09.09.2011 № 878 «Об утверждении Инструкции по профилактике инфаркта мозга и транзиторных ишемических атак» (далее — приказ МЗ РБ № 878) и «Клиническим протоколам диагностики и лечения пациентов с патологией нервной системы» (далее — клинические протоколы).

Группа среднего риска. Группа компенсированной эндотелиальной дисфункции, концентрация NO_x при первом измерении (1–2-е сут) составляет >33 мкМ, при повторном измерении (10-е сут) — <33 мкМ.

Мероприятия в группе. Динамическое наблюдение, выполнение мероприятий по вторичной профилактике ИМ согласно приказу МЗ РБ № 878 и клиническим протоколам. Динамический контроль NO_x на 30-е сут острого периода. При отсутствии нарастания уровня NO_x — действия аналогичны таковым в группе 1.

Группа высокого риска. Концентрация NO_x не превышает пороговые значения: при первом измерении (1–2-е сут <33 мкМ), но нарастает в острейшем периоде: при повторном измерении (10-е сут >33 мкМ), что свидетельствует об усугублении эндотелиальной дисфункции и является предиктором

неблагоприятного прогноза по возникновению ИМ.

Мероприятия в группе. Динамическое наблюдение, выполнение мероприятий по вторичной профилактике ИМ согласно приказу МЗ РБ № 878 и клиническим протоколам. Динамический контроль NO_x на 30-е сут острого периода. Обязательна дополнительная антиоксидантная терапия.

Группа крайне высокого риска. Концентрация NO_x стабильно высокая, что свидетельствует о выраженной эндотелиальной дисфункции в сочетании с асептическим воспалительным процессом, концентрация NO_x составляет при первом (1–2-е сут) и при повторном измерении (10-е сут >33 мкМ).

Мероприятия в группе. Динамическое наблюдение, выполнение мероприятий по вторичной профилактике ИМ согласно приказу МЗ РБ № 878 и клиническим протоколам. Динамический контроль NO_x на 30-е сут острого периода. Антиоксидантная терапия. Дополнительное обследование для выявления базового процесса, приводящего к активации NO-синтаз (ультрасонографическая диагностика сердца, ультразвуковая диагностика состояния органов брюшной полости).

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

1. Забор материала для определения уровня NO_x следует проводить утром, натощак, в покое, так как прием пищи, богатой нитратами, оказывает влияние на результаты определения концентрации NO_x в плазме крови.

2. Обязательным условием является депривация курения у пациентов с ПНМК.

3. Искажение результатов определения концентрации NO_x в плазме крови может быть вызвано приемом нитрат-содержащих лекарственных средств, что следует учитывать при составлении карты пациента.