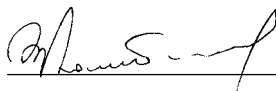


**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра



В.В. Колбанов

3 октября 2003 г.

Регистрационный № 8-0103

**СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
МИЕЛИНОТОКСИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ
СЫВОРОТКИ КРОВИ
И СПИННОМОЗГОВОЙ ЖИДКОСТИ**

Инструкция по применению

Учреждение-разработчик: Белорусская медицинская академия
последипломного образования

Авторы: д-р мед. наук, проф. Н.Ф. Филиппович, д-р мед. наук
Г.Я. Хулуп, канд. мед. наук А.Н. Филиппович, канд. мед. наук
К.Н. Лапуть

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Способ определения миелинотоксической активности сыворотки крови и спинномозговой жидкости предназначен для установления стадии активности процесса при рассеянном склерозе, в том числе при первично и вторично прогрессирующих и ремитирующей форме рассеянного склероза, а также в его начальном периоде.

Принцип метода

Принцип метода основан на оценке токсического влияния сывороток (спинномозговой жидкости) больных рассеянным склерозом на культуры полушарий мозга (крыс и др.) с миелинизированными нервными волокнами (Коновалов Г.В. и соавт., 1981; Филиппович Н.Ф. и соавт., 1998 (патент № 3882 от 20.03.1998)).

Радиометрически-биологическим методом оценивается миелинотоксическая активность сыворотки крови (спинномозговой жидкости). Принцип метода заключается в замещении изотопами холестерина молекул миелина, разрушенных сывороткой (спинномозговой жидкостью) больных рассеянным склерозом, обладающей миелинотоксической активностью.

ОБОРУДОВАНИЕ, МАТЕРИАЛЫ И РЕАКТИВЫ

Исследования проводятся в лаборатории, располагающей необходимым оборудованием для работы с индикаторными дозами изотопов: жидкостный сцинтилляционный датчик (Jsocar 300 или др.), место для работы с изотопами, их хранения, емкость для слива использованных радиоактивных продуктов. Необходимы также: термостат (37° С), сушильный шкаф, автоклав, холодильник (+4° С), газовая горелка или спиртовка, центрифуга (2000 об./мин), баллон с газовой смесью для насыщения питательной среды кислородом и углекислым газом (5% CO₂ и 95% O₂), кювета, фильтровальная бумага.

Посуда

Для исследования 20 сывороток (включая две контрольные) необходимы:

1. Пипетки: микропипетки для разведения изотопа на 1 мл — 20 шт., на 5 мл — 2 шт., на 10 мл — 1 шт. (для приготовления сред и обработки сывороток больных).

2. Бактериологические пробирки с ватно-марлевыми пробками для получения крови больных и обработки сывороток — 40 шт.

3. Бактериологические пробирки с резиновыми пробками для хранения сыворотки и изотопов (по мере надобности).

4. Колба для приготовления питательной среды — 1 шт.

5. Камера Максимова, ее можно заменить любым биксом или чашкой Петри.

6. Пластинка из белой резины, вырезанная из широкой пробки — 1 шт.

7. Пенициллиновые флаконы для инкубации культур — 40 шт.

Посуду необходимо тщательно вымыть. Новую посуду помещают на 30 мин в бихромат калия с разведенной серной кислотой, затем тщательно промывают под струей холодной воды, опускают в теплый мыльный раствор и кипятят в течение 1 ч, затем снова промывают теплой водой и помещают в 5% раствор серной кислоты (обычно на ночь). После этого посуду ополаскивают в холодной воде, затем в дистиллированной, высушивают в сушильном шкафу, стерилизуют.

Резиновые пробки и пластинку моют в теплой воде и кипятят 20 мин в дистиллированной воде. Посуда, использованная в работе, не подвергается повторной обработке в бихромате калия.

Стандартные флаконы для жидкостного сцинтилляционного счетчика после подсчета проб обрабатывают следующим образом: сцинтиллятор с пробами сливают, а флаконы закладывают в бак с теплым мыльным раствором и кипятят в нем 45 мин. Затем посуду промывают по 20 раз теплой водопроводной водой, в одной смене дистиллированной воды и высушивают в сушильном шкафу.

Инструменты

1. Большие ножницы для вскрытия черепной коробки крыс. Ножницы глазные для выделения головного мозга, два глазных пинцета с заостренными браншами для удаления мягких мозговых оболочек.

2. Специальная камера с объемом рабочей части 1 мм³ для дозированного забора нервной ткани.

Реактивы

1. Эфир наркотический — 20 мл, спирт 96° — около 800 мл., физиологический раствор — 2 мл.

2. Питательные среды: среда Игла (производства Института полиомиелита АМН СССР, Москва) — 50 мл, к ней прилагается глютамин 3% — 0,5 мл, глюкоза 40% в ампулах — 1,6 мл.

3. ЗН-холестерин 7,8 (удельная активность — 10 Ки/мм, «Изотоп» СССР) в виде порошка в упаковке 1 мКи в ампуле. Порошок меченного холестерина разводят в бензоле. Бензольный раствор высушивают в токе азота, затем добавляют 4% Tween-20 в метиловом спирте, после такого разведения раствор снова высушивают в токе азота и затем суспензию разводят в 1 мл 0,15 моль NaCl. Этот маточный раствор хранится в холодильнике длительное время — 1–2 года. По мере необходимости по 0,05 мл этого раствора (50 мКи ЗН-холестерина) разводят в 5 мл среды Игла (без сыворотки) и получают рабочий раствор, в 1 мл которого содержится 10 мКи холестерина.

4. Сцинтилляционная жидкость для подсчета радиоактивности. Состав: 5 г ППО, 100 мг ПОПОП на 1 мл толуола (лучше брать готовую сцинтилляционную жидкость-107). Количество сцинтиллятора, необходимого для исследования 20 сывороток, — 200 мл.

ТЕХНОЛОГИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Для определения миелинотоксической активности больных рассеянным склерозом направляют на кафедру неврологии БелМАПО по адресу: Минский р-н, пос. Лесной, Минская областная клиническая больница (до 15.00 с понедельника по четверг). Больной направляется с сопроводительным документом (направлением), в котором невропатолог поликлиники или стационара указывает фамилию, имя, отчество больного, его возраст, диагноз, анамнестические сведения, краткое описание неврологического статуса. В направлении указывается адрес направившего учреждения, фамилия и телефон направившего невропатолога.

Для получения сыворотки кровь из локтевой вены обследуемого набрать в стерильную бактериологическую пробирку в количестве 5 мл, освободить от кровяного сгустка и центрифугировать в течение 15 мин при 2000 об./мин. Полученную сыворотку отсосать грушей в стерильные пробирки, закрыть ватно-марлевыми пробками, не прогревая их с целью сохранения собственного компонен-

та, что позволяет выявить максимальный миелинотоксический эффект. Если же сыворотки не могут быть исследованы в ближайшие дни, то они должны храниться при температуре -20°C . Срок их хранения не должен превышать 2 мес.

Методика определения миелинотоксической активности сыворотки крови и спинномозговой жидкости

Определение демиелинизирующих свойств сывороток больных рассеянным склерозом проводится по следующей схеме:

– 1-е сутки: взятие крови больного, приготовление сывороток и крови; приготовление культур головного мозга взрослых крыс, питательных сред и рабочего раствора холестерина; постановка основного этапа исследования с инкубацией эксплантатов с меченым холестерином в присутствии испытуемой сыворотки.

– 2-е сутки: обработка культур, радиометрический анализ и учет результатов исследования.

Если используются замороженные сыворотки, то непосредственно перед исследованием их размораживают и для удаления белкового осадка дважды центрифугируют при 2000 об./мин в течение 30 мин.

В качестве контроля используются сыворотки здоровых людей, прогретые при 56°C для инактивации комплемента, которые не дают токсического эффекта в культурах нервной ткани. Эти сыворотки постоянно используются в качестве контроля во всех исследованиях миелинотоксических свойств испытуемых сывороток больных людей. Исследование каждой партии сывороток сопровождается изучением двух сывороток: заведомо «положительной» больного и заведомо «отрицательной» здорового донора. Указанные контрольные сыворотки хранятся в замороженном состоянии и своевременно возобновляются.

При подготовке культуры нервной ткани материал для культивирования берется от взрослых крыс любого пола массой 150–200 г. Из головного мозга одной крысы может быть подготовлено 240 эксплантатов, которые идут на исследование 19 сывороток больных и одной контрольной. Каждая сыворотка тестируется на 12 эксплантатах в двух флаконах.

Крысы умерщвляются эфиром, удаляется кровь, а затем обнажается и вскрывается черепная коробка, извлекается головной мозг,

помещается в лунку камеры Максимова с питательной средой (без сыворотки), насыщенной смесью кислорода (96%) и углекислым газом (5%). Затем удаляются мягкие мозговые оболочки. Кора больших полушарий глазным скальпелем отсекается от белого подкоркового вещества и перекладывается на резиновую пластинку, смоченную питательной средой. Взятые участки мозга разрезаются на несколько продольных полос шириной 1 мм, с помощью устройства для дозированного забора мозговой ткани от каждой полосы отделяются кусочки объемом в 1 мм³, закладываются в специальную камеру объемом 1 мм³, излишки мозговой ткани удаляют, а основную массу переносят в пенициллиновые флаконы с заранее приготовленной питательной средой, содержащей сыворотки больных или здоровых людей. В каждый флакон помещают по 6 эксплантатов нервной ткани, в питательную среду добавляют меченный холестерин и аэрируют смесь газов (5% CO₂ и 95% O₂) через пастеровскую пипетку, соединенную с баллоном, содержащим смесь газов.

Используются: питательная среда Игла 50%, глюкоза до конечной концентрации 600 мг на 100 мл среды, глютамин из расчета 1 мл 3% раствора на 100 мл среды, испытуемая сыворотка 50%.

Постановка основного теста проводится следующим образом: 20 флаконов с эксплантатами устанавливаются в штативе в один ряд. Во все сосуды одной пипеткой вносится по 0,4 мл питательной среды. К 18 флаконам отдельными пипетками добавляется по 0,5 мл испытуемой сыворотки. В двух последних флаконах в качестве контроля используются сыворотки здоровых людей, инактивированные при 56° С.

В каждый флакон с культурами добавляется по 0,1 мл рабочего раствора 3Н-холестерина до конечной концентрации 1 мкКи/мл. Флаконы закрываются резиновыми пробками и помещаются в термостат при 37° С на 18 ч.

По окончании инкубации эксплантаты извлекаются пипеткой на сухую фильтровальную бумагу, а жидкость из флаконов сливается в специальную емкость. Бумага с культурами помещается в ванночку с физиологическим раствором, который дважды меняется в течение часа для отмывания эксплантатов от невключившегося изотопа. Затем бумага высушивается, разрезается на ровные квадраты (длина

сторон по 0,5 см) таким образом, чтобы культивируемый фрагмент нервной ткани располагался в центре квадрата. Бумажный квадрат помещается кусочком ткани кверху в отдельный сцинтилляционный флакон, в который наливается сцинтилляционная жидкость по 0,5 мл. В каждой пробе измеряется радиоактивность.

Количественная оценка миелинотоксического действия сывороток больных рассеянным склерозом проводится на основании разницы показателей включения изотопа в контрольные (культуры, инкубируемые с эталонными сыворотками здоровых людей) и испытуемые культуры (культуры, инкубируемые с сыворотками больных людей).

Расчет миелинотоксической активности

Миелинотоксическая активность вычисляется путем определения отношения суммарных радиоактивностей в тканях культур опыта (Zon) к сумме радиоактивностей в тканях культур, использованных в качестве контроля (ZK, эксплантаты, инкубируемые с контрольными прогретыми до 56° С сыворотками):

$$MTA = Z_{on} / ZK \times 100 - ZK$$

Результаты исследования в усл. ед. соответствуют проценту подавления или стимуляции меченого холестерина.

Интерпретация результатов

В зависимости от показателей миелинотоксической активности сыворотки крови выделяют следующие степени активности рассеянного склероза:

- I степень активности — от 5 до 20 усл. ед. ($7,6 \pm 1,2$ усл. ед.);
- II степень активности — от 21 до 39 усл. ед. ($22,1 \pm 0,85$ усл. ед.);
- III степень активности — от 41 до 70 усл. ед. ($40,2 \pm 1,21$ усл. ед.);
- IV степень активности — от 71 до 90 усл. ед. ($79,3 \pm 4,4$ усл. ед.).

На первом этапе внедрения метода проводится исследование миелинотоксической активности сыворотки крови (спинномозговой жидкости) в ЦНИЛ БелМАПО, в последующем планируется внедрение метода в радиометрических лабораториях областных больниц.

Степень обязательности направления на исследование миелинотоксической активности сыворотки крови обусловлена необходимостью установления стадий активности демиелинизирующего процесса (низкая — I, умеренно выраженная — II, высокая — III,

очень высокая — IV) для проведения дифференцированной терапии (общеукрепляющая, сосудорегулирующая, иммуностимулирующая, иммунодепрессантная) (Гусев Е.И., 2000; Завалишин И.А., 2001; Филиппович А.Н., 2001, 2003).

Контроль качества

Для оценки качества диагностической реакции необходимо сопоставить миелинотоксическую активность сыворотки крови (спинномозговой жидкости) исследуемого больного и донора.

Техника безопасности

При работе с J^{131} следует соблюдать правила работы с радиоактивными веществами по 3-му классу работ (нормы радиационной безопасности НРБ-2000 и основные санитарные правила ОСП-72/87 работы с радиоактивными веществами и другими источниками ионизирующих излучений). Химическая посуда и оборудование, которые используются при работе с радиоактивными веществами, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.

При работе с J^{131} следует надевать одноразовые резиновые перчатки (ГОСТ 3–88), так как образцы человеческой крови и спинномозговой жидкости следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные передавать ВИЧ, вирус гепатита В или другие вирусные инфекции.

Работы следует проводить с соблюдением мер предосторожности, предусмотренных приказами МЗ РБ № 66 от 20.04.1993 г. и № 351 от 16.12.1998 г.

Клинико-диагностическая значимость исследования

Количественная оценка миелинотоксической активности сыворотки крови (спинномозговой жидкости) позволяет объективно оценить наличие и степень активности демиелинизирующего процесса (I, II, III, IV степень).

Квалификация используемых веществ: бензол (чга), азот, хлористый натрий (чга), спирт (ректификат), фильтровальная бумага.

Перечень возможных осложнений: при соблюдении техники исполнения способа осложнений не возникает.

Противопоказания к применению: противопоказаний к применению способа нет.