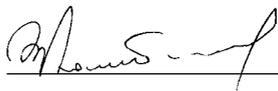


**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра здравоохранения



В.В. Колбанов

21 июня 2005 г.

Регистрационный № 91–1004

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА
ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ
КЛЕТОК В ПЛАЗМЕ КРОВИ**

Инструкция по применению

Учреждение-разработчик: Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет

Авторы: д-р мед. наук, проф. С.Н. Занько, канд. мед. наук, доц. Н.И. Киселева, д-р мед. наук, проф. А.П. Солодков, Ж.В. Хотетовская

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Выявление состояния дисфункции эндотелия с целью диагностики поражения сосудов, определения степени тяжести заболевания и оптимизированного выбора лекарственных препаратов с точки зрения их влияния на эндотелий.

ОБОРУДОВАНИЕ И ХИМИЧЕСКИЕ РЕАКТИВЫ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ МЕТОДА

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. Центрифуга лабораторная ОПн-8.
8. Пробирки конические центрифужные.
9. Пробирки пластиковые.
10. Микропипетки (№ 12).
11. Камера Горяева.
12. Микроскоп лабораторный.

ТЕХНОЛОГИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

1. Приготовление исходных растворов реагентов

1.1. Цитрат натрия. Растворить 3,8 г реактива в 100 мл дистиллированной воды (3,8% раствор).

1.2. Аденозиндифосфорная кислота (АДФ). Навеску 0,0054721 мг АДФ растворить в 10 мл дистиллированной воды (1 ммоль АДФ).

1.3. Метиленовый синий. Растворить 100 мг метиленового синего в 100 мл дистиллированной воды (0,1% раствор).

2. Проведение основного опыта

2.1. В пробирку, содержащую 1 мл 3,8% цитрата натрия, добавить 9 мл крови, взятой путем пункции периферической вены (соотношение 1 : 10). Пробирку с кровью осторожно и тщательно перемешать.

2.2. Пробирку с кровью центрифугировать при 1000 об./мин 10 мин.

2.3. Плазму, обогащенную тромбоцитами, перенести в пластиковую пробирку.

2.4. К 3,8 мл обогащенной тромбоцитами плазмы (ОТП) добавить 0,2 мл 1 ммоль АДФ.

2.5. Пробирку встряхивать в течение 10 мин при комнатной температуре на механическом смесителе со смещенным центром.

2.6. Центрифугировать пробирку при 2000 об./мин в течение 10 мин.

2.7. Супернатант, представляющий собой бедную тромбоцитами плазму, перенести по 1 мл в пластиковые пробирки.

2.8. В пробирки добавить по 20 мкл 0,1% раствора метиленового синего.

2.9. Подсчет циркулирующих эндотелиальных клеток проводить во всем объеме камеры Горяева (10 мкл). От одного пациента считать 10 проб по 10 мкл обогащенной клетками плазмы. Подсчет начинать с верхнего левого угла камеры Горяева. Суммировать данные, полученные при подсчете 10 проб. Таким образом, находят количество циркулирующих эндотелиальных клеток в 100 мкл обогащенной клетками плазмы.

Эндотелиальные клетки просматриваются как большие (35 × 50 мкм) полигональные клетки с овальным, расположенным в центре ядром.

2.10. Количество циркулирующих эндотелиальных клеток выражают в единицах на 100 мкл плазмы.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Противопоказаний к применению нет.

ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ

1. Для уменьшения ошибки в определении количества циркулирующих эндотелиальных клеток подсчет проводят в 10 пробах, содержащих по 10 мкл обогащенной клетками плазмы одного пациента или донора. Затем суммируют эти 10 значений. Полученная цифра отражает количество циркулирующих эндотелиальных клеток в 100 мкл плазмы.

2. Иногда эндотелиальные клетки образуют конгломераты из 2–3 и более клеток, однако при этом хорошо видны границы отдельных клеток и их ядра, что позволяет точно их учитывать.