

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель Министра
_____ Е.Л. Богдан
_____ 2020 г.
Регистрационный № 127-1220

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФАЗЫ РАНЕВОГО ПРОЦЕССА
ХРОНИЧЕСКОЙ ЯЗВЫ КОЖИ**
инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: государственное учреждение
«Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и
экологии человека», учреждение образования «Гомельский
государственный медицинский университет»

АВТОРЫ: к.м.н., доцент Ярец Ю.И., к.б.н., доцент Шевченко Н.И.,
к.м.н. Славников И.А., д.м.н., доцент Рожко А.В.,
д.м.н., профессор Дундаров З.А.

Гомель, 2020

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод определения фазы раневого процесса хронической язвы кожи (I 83.0; I 83.2; L 89; L 97; E.10.6; E.11.6). Метод включает оценку цитотоксичности клинических штаммов бактерий на культуру аутологичных фибробластов. Метод может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику и лечение пациентов с хроническими язвами кожи.

Инструкция предназначена для врачей лабораторной диагностики, врачей-бактериологов, врачей-хирургов, иных специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с хроническими язвами кожи в амбулаторных и стационарных условиях.

**ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ,
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ, БИМЕДИЦИНСКИХ
КЛЕТОЧНЫХ ПРОДУКТОВ, РЕАКТИВОВ И Т.Д.:**

1. стандартное оборудование, расходные материалы, реактивы, питательные среды и др., используемые для проведения бактериологических лабораторных исследований;
2. культура аутологичных фибробластов, приготовленная в соответствии с инструкцией по применению № 066-1016 от 17.02.2017 г.;
3. клинические штаммы бактерии, выделенные из хронической язвы кожи пациента в виде чистой культуры и идентифицированные стандартными микробиологическими методами;
4. стандартное оборудование, расходные материалы, реактивы и др., используемые для проведения проточной цитофлуориметрии, биохимических лабораторных исследований.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ:

Заболевания или патологические состояния, характеризующиеся наличием:

1. трофических язв нижних конечностей, резистентных к традиционным лечебным мероприятиям;
2. длительно незаживающих раневых дефектов кожи и мягких тканей различной локализации и этиологии.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ: отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

1. Получение компонентов бактериальной биопленки

Стерильное покровное стекло размером 24x48 мм помещают вертикально во флакон с питательной средой (триптиказо-соевый бульон, содержащий 0,25% глюкозы). Во флакон вносят 1 мл бактериальной суспензии в концентрации 5×10^8 КОЕ/мл, инкубируют 3 часа при температуре 37°C и после этого добавляют питательную среду в объеме 40 мл. Биопленку выращивают в течение 72 часов. После окончания культивирования стекло из флакона извлекают пинцетом, трижды промывают от не прикрепившихся клеток в буферном растворе. Биопленку соскабливают с поверхности покровного стекла с помощью скребка для клеточных культур, добавляют минимальный объем изотонического раствора хлорида натрия. Полученную суспензию фильтруют через мембранные фильтры с размером пор 0,2 мкм для удаления бактериальной биомассы.

2. Культивирование фибробластов с компонентами бактериальной биопленки

В чашки Петри помещают культуру фибробластов, в посевной дозе 5×10^4 /мл. В питательную среду для фибробластов добавляют 0,150 мл фильтрата бактериальной биопленки. В качестве контроля используют фибробласты без добавления компонентов биопленки. Состояние клеток контролируют ежедневно, результаты определения цитотоксичности представляют на 3-и сутки культивирования. Культуры исследуют прижизненно на инвертированном микроскопе. Оценивают структурные особенности клеток и монослоя в целом.

3. Определение цитотоксичности бактериальной биопленки на культуру фибробластов

3.1 Анализ активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в культуральной среде и клетках монослоя

Культуральную среду отбирают в пробирки типа «эппендорф» и центрифугируют. Сохранившиеся на носителе клетки разрушают путем двухкратного замораживания-оттаивания. Отбирают по 1 мл культуральной среды и лизата клеток. Активность ЛДГ определяют стандартными биохимическими методами с использованием соответствующих наборов реагентов и оборудования. Количество поврежденных клеток выражают как процентное отношение активности ЛДГ в среде к суммарной активности ЛДГ в лизате и в ростовой среде:

$$\text{ПК (\%)} = (\text{ЛДГ}_c / \text{ЛДГ}_л + \text{ЛДГ}_c) \times 100,$$

где ПК – количество поврежденных клеток, ЛДГ_с – активность ЛДГ в среде; ЛДГ_л – активность ЛДГ в лизате.

3.2 Анализ пролиферативной активности

Определяют время удвоения культуры (ВУ) и индекс пролиферации (ИП) по следующим формулам:

$$\text{ВУ} = t \times \lg 2 / \lg(N_t / N_0); \text{ИП} = N_2 / N_1,$$

где, t – время инкубации (ч); N_0 – начальная доза клеток на пластике; N_t – количество клеток, выросших за время t ; N_1 – количество клеток монослоя, принятое как исходное; N_2 – количество клеток монослоя через 24 часа культивирования.

Подсчет клеток производят по общепринятым методикам. Дополнительно контролируют фиксацию клеток к пластику, морфологию.

3.3 Анализ экспрессии поверхностных маркеров фибробластов с помощью проточной цитофлуориметрии

Клеточную суспензию фибробластов в количестве $3,5 \times 10^6$ кл/1 мл фосфатно-солевого буфера инкубируют с панелью конъюгатов CD-маркерных моноклональных антител с флуорохромами. Измерения проводят с использованием проточного цитофлуориметра. Оценивают экспрессию CD 73, CD 44, CD 10, CD 90, CD 49b/CD 29. Гейтирование проводят по CD 105, виментину.

3.4 Оценка жизнеспособности фибробластов и апоптоза

Оценку жизнеспособности культивированных фибробластов выполняют с использованием флуоресцирующего ДНК-красителя 7-AAD. Уровень апоптоза определяют по количеству CD95+ клеток.

4. Интерпретация результатов определения цитотоксичности

Выполняется в соответствии с таблицей.

Таблица – Интерпретация результатов определения цитотоксичности

| Показатель | Проявление цитотоксичности на фибробласты |
|--------------|---|
| | % от контроля* |
| ПК, % | ≥ 210 |
| ВУ, час | ≥ 130 |
| ИП, отн.ед. | ≤ 85 |
| CD 73, % | ≤ 70 |
| CD 44, % | ≤ 75 |
| CD 10, % | ≤ 75 |
| CD 90, % | ≤ 70 |
| CD 49b/CD 29 | ≤ 75 |

| | |
|----------------------------------|--|
| 7-AAD+, % | ≥ 300 |
| CD 95+, % | ≥ 230 |
| Визуальное состояние монослоя | Признаки нарушения адгезии клеток, наличие нефиксированных фибробластов в среде |

* - нормальные значения устанавливаются индивидуально для каждой лаборатории

Проявление цитотоксичности бактерий, выделенных из хронической язвы кожи, на культуру аутологичных фибробластов, обосновывает патогенный потенциал бактерий и может явиться причиной снижения функциональной активности и гибели пересаженных клеток. Наличие в хронической язве кожи бактерий-продуцентов биопленки, обладающих цитотоксичностью, является критерием пролонгации фазы воспаления раневого процесса и определяет показания к использованию эффективных методов дебридмента для стимуляции перехода фазы воспаления в фазу регенерации. Предложенный метод исследования также позволяет выработать оптимальную лечебную тактику для пациентов с хроническими язвами кожи на амбулаторном этапе.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Осложнений нет. Ошибки могут быть связаны с нарушением технологии выполнения анализа.

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель организации

(подпись)

(инициалы, фамилия)

« ____ » _____ 20__ г.

**АКТ
о практическом использовании результатов исследования**

В _____
(сфера, в которой нашли практическое применение результаты исследования*)

Комиссия в составе _____
_____ настоящим подтверждает,

что _____
(название структурного подразделения организации)

*проведено опытно-промышленное испытание (осуществлено внедрение в технологический процесс, в учебный процесс и др.**)*

_____ (указываются конкретные научные результаты, которые нашли применение)
полученных

_____ (фамилия, имя, отчество автора (авторов) исследования)
при выполнении *программы (проекта, темы НИР**)* _____

_____ (название программы, проекта, темы НИР**)
для _____

_____ (указываются решаемые практические задачи)
на основании чего _____

_____ (приводятся конкретные результаты практического использования)
Экономический эффект от использования результатов составил _____
(расчет прилагается)***.

Члены комиссии:

(подпись)

(инициалы, фамилия)