

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра здравоохранения



В.В. Колбанов

21 июня 2005 г.

Регистрационный № 107-1104

**КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ОБЩИХ ФОСФОЛИПИДОВ СУРФАКТАНТА
В ИНДУЦИРОВАННОЙ МОКРОТЕ
ПРИ САРКОИДОЗЕ ОРГАНОВ ДЫХАНИЯ**

Инструкция по применению

Учреждения-разработчики: Научно-исследовательский институт пульмонологии и фтизиатрии, Белорусский государственный медицинский университет

Авторы: канд. мед. наук Г.Л. Бородина, канд. мед. наук И.М. Лаптева, канд. мед. наук И.Л. Котович, д-р мед. наук, проф. А.Д. Таганович, М.И. Дюсьмикеева

ВВЕДЕНИЕ

Широкое внедрение в практику пульмонологии метода бронхоальвеолярного лаважа (БАЛЖ) позволило достичь значительного прогресса в понимании иммунопатогенеза саркоидоза. Важную роль в развитии заболевания играет структурно-функциональное состояние альвеолярного отдела легких. В непосредственном контакте с иммунными клетками в альвеолах находится легочный сурфактант. В настоящее время установлено, что сурфактант обладает не только поверхностно-активными свойствами, но и целым рядом иммуномодулирующих эффектов, а нарушения его состава и функций отражают характер развития многих заболеваний органов дыхания. Обнаружено, что изменения фосфолипидного состава сурфактанта при саркоидозе могут быть использованы в качестве диагностических и прогностических критериев саркоидоза органов дыхания.

Наиболее распространенным методом получения от пациента фракций легочного сурфактанта для последующего анализа является БАЛЖ. Однако в связи с тем, что лаважную жидкость получают только при бронхоскопии, вышеуказанный способ связан с определенным риском для больного, обладает рядом противопоказаний, достаточно сложен и требует оснащения дорогостоящим оборудованием, что делает его непригодным для применения в амбулаторных условиях. Вместо лаважа в качестве исследуемого биологического материала целесообразно было бы использовать мокроту пациентов, однако в большинстве случаев при саркоидозе мокрота спонтанно не отделяется. Решением данного вопроса является использование индуцированной мокроты, то есть полученной после ингаляции гипертонического раствора. Метод исследования индуцированной мокроты отличается неинвазивностью, простотой выполнения, безопасностью для пациента, возможностью многократного получения материала, отсутствием необходимости в дорогостоящем оборудовании и позволяет в 76–95% случаев получить мокроту даже у здоровых лиц. В результате проведенных исследований на основе сравнительного анализа диагностической эффективности БАЛЖ и индуцированной мокроты доказано, что

индуцированная мокрота, так же, как БАЛЖ, является универсальным биологическим материалом, отражающим характер патологических изменений в органах дыхания, и может использоваться для изучения общего уровня фосфолипидов сурфактанта.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

1. Диагностика и дифференциальная диагностика саркоидоза органов дыхания.

В настоящее время метод получения и исследования индуцированной мокроты активно используется при диагностике туберкулеза и рака легких, аспергиллеза, неспецифических заболеваний органов дыхания. Уровень общего липидного фосфора в индуцированной мокроте в интервале от 60 до 140 мкмоль/л характерен для саркоидоза и может служить дополнительным диагностическим и дифференциально-диагностическим критерием саркоидоза.

2. Прогнозирование течения саркоидоза органов дыхания.

Прогнозирование течения саркоидоза остается одной из самых сложных и важных задач в ежедневной клинической практике пульмонолога и фтизиатра. Так как этиология саркоидоза не установлена, прогностические критерии процесса до сих пор являются предметом научных дискуссий. Уровень общих фосфолипидов может рассматриваться как один из прогностических критериев при саркоидозе. При содержании общих фосфолипидов в интервале от 55,67 до 92,13 мкмоль/л прогнозируют неблагоприятное течение саркоидоза, а при уровне общего липидного фосфора в интервале от 95,76 до 180,44 мкмоль/л — благоприятное течение процесса.

3. Оценка эффективности лечения при саркоидозе органов дыхания.

Повышение уровня фосфолипидов сурфактанта в процессе лечения является одним из показателей эффективности терапии саркоидоза. Повторные исследования индуцированной мокроты с изучением содержания общих фосфолипидов на фоне лечения больных позволят оптимизировать схемы патогенетической терапии, сократить сроки пребывания пациентов в стационаре и объективизировать уровень реабилитации больных во время диспансерного наблюдения.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ, МЕДИЦИНСКИХ ПРЕПАРАТОВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ И ИНСТРУМЕНТАРИЯ

1. Ультразвуковой небулайзер со скоростью подачи аэрозоля от 0,87 до 2,0 мл/мин и средним массовым аэродинамическим диаметром частиц ≤ 5 мкм.
2. Пикфлоуметр.
3. Быстродействующий бронходилататор (сальбутамол, фенотерол) в виде дозированного аэрозоля.
4. Растворы NaCl 3–5%.
5. Стерильная посуда для сбора мокроты.

ТЕХНОЛОГИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Методика получения индуцированной мокроты

Индуцированную мокроту получают путем ингаляции 3–5% гипертонического раствора с помощью ультразвукового небулайзера по методу I. Pin, P.G. Gibson (1992) в модификации Т.А. Попов, М.М. Pizzichini, E. Pizzichini (1995).

Перед началом ингаляции больному должна быть проведена пикфлоуметрия, после чего он делает 2 вдоха бронходилататора и через 20–30 мин приступает к ингаляции 3% раствора NaCl через ультразвуковой небулайзер продолжительностью 7 мин. По окончании ингаляции пациент должен прополоскать рот водой, откашляться и собрать мокроту в стерильную посуду. После этого проводится контрольная пикфлоуметрия. Если получить мокроту не удалось, процедуру повторяют, используя последовательно 4% и 5% растворы NaCl вместо 3%. Если во время ингаляции появились одышка, удушье, затрудненное дыхание или произошло снижение пиковой скорости выдоха на 20% и более, процедуру необходимо прекратить.

Исследование индуцированной мокроты должно быть проведено не позднее чем через 2 ч после получения материала, на протяжении всего этого времени образцы мокроты должны храниться при температуре 4° С. Качество материала оценивают на основании полученного объема мокроты и степени примеси к ней слюны. Наиболее подходящими для исследования считаются слизистые

слепки размером более $4,5 \times 9,0$ мм, с минимальными примесями слюны. Может потребоваться просмотр мокроты под инвертированным микроскопом, после чего отбирается материал с минимальным содержанием плоских эпителиальных клеток (менее 20% от всех клеток). Следующий этап — диспергирование и гомогенизация мокроты, для чего используют дитиотреитол (ДТТ) — вещество с низким окислительно-восстановительным потенциалом, разрушающее дисульфидные связи гликопротеинов слизистого секрета и не оказывающее влияния на клеточные и растворимые факторы мокроты. Раствор ДТТ готовится непосредственно перед исследованием, препарат разводится до 0,1% концентрации и добавляется к мокроте в соотношении 1 мл ДТТ на 1 мг мокроты. Смесь мокроты с ДТТ встряхивают в течение 10 мин, клеточную суспензию отмывают в сбалансированном солевом растворе Хенкса (на 1 л 10-кратного раствора Хенкса требуется 80 г NaCl; 4 г KCl; 2 г $MgSO_4 \times 7H_2O$; 2,75 г $CaCl_2 \times 6H_2O$; 0,6 г KH_2PO_4 ; 1,53 г $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$; 10 г глюкозы и дистиллированная вода до 1000,0) или забуференном физиологическом растворе, содержащем 0,2 моль Na_2HPO_4 и 0,2 моль KH_2PO_4 , фильтруют через нейлоновую марлю и центрифугируют на центрифуге типа ОПМ-3 или ОС-6М в течение 10 мин при 1000 об./мин. Для анализа используют супернатант, полученный в результате центрифугирования.

Количественное определение фосфолипидов

Экстрагируют липиды, содержащиеся в индуцированной мокроте, по методу J. Folch и соавт. (1957) с использованием обычных растворителей. После разделения водной и липидной фракций верхний слой, содержащий водорастворимые соединения, отбрасывают. Нижний хлороформенный слой, содержащий липиды, упаривают под струей газообразного азота. Сухой осадок липидов растворяют в 0,2 мл хлороформа («Реахим», Россия). Полученный экстракт используют для количественного определения общего липидного фосфора методом V.E. Vaskovsky, E.Y. Kostetsky, I.M. Vasendin (1975). Замер оптической плотности проб производят на СФ-26 (ЛОМО, Россия) или СОЛАР PV 1251–С при 815 нм. Количество фосфолипидов пересчитывают на 1 л индуцированной мокроты и выражают в микромолях фосфора на литр индуцированной мокроты.

ВОЗМОЖНЫЕ ОСЛОЖНЕНИЯ

1. Индивидуальная непереносимость бронхолитика или гипертонического раствора.

2. Головокружение из-за форсирования дыхания во время ингаляции.

Чтобы избежать осложнений, перед началом исследования необходимо объяснить больному суть метода, его безвредность и безопасность и проследить за правильностью выполнения.

Противопоказания к применению метода:

1. Дыхательная недостаточность II–III ст.

2. Выраженный бронхоспастический синдром.