

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

 УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель Министра
_____ Д.Л.Пиневич
_____ 2016 г.
Регистрационный № 270-1215

**МЕТОД ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ
МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ
ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ПОРАЖЕНИИ ПЕЧЕНИ
У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ,
ПОЛУЧАЮЩИХ АНТИРЕТРОВИРУСНУЮ ТЕРАПИЮ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ–РАЗРАБОТЧИК:

Учреждение образования

«Гродненский государственный медицинский университет»

АВТОРЫ:

д.м.н., профессор В. М. Цыркунов, к.м.н., доцент М. Н. Курбат

Гродно, 2016

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневиц
18.03.2016
Регистрационный № 270-1215

**МЕТОД ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ
ДИСФУНКЦИИ ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ПОРАЖЕНИИ ПЕЧЕНИ
У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ,
ПОЛУЧАЮЩИХ АНТИРЕТРОВИРУСНУЮ ТЕРАПИЮ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: УО «Гродненский государственный
медицинский университет»

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф. В. М. Цыркунов, канд. мед. наук, доц.
М.Н. Курбат

Гродно 2016

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод диагностики митохондриальной дисфункции при антиретровирусной терапии (АРТ) ВИЧ-инфекции, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику токсического поражения печени антиретровирусными лекарственными средствами.

Метод, изложенный в настоящей инструкции, предназначен для врачей-инфекционистов, врачей-терапевтов и иных врачебных специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с ВИЧ-инфекцией.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Набор реагентов и медицинских изделий для определения:
 - концентрации общего билирубина, активности аланинаминотрансферазы (АлАТ), аспартатаминотрансферазы (АсАТ), γ -глутамил-транспептидазы (ГГТП), щелочной фосфатазы (ЩФ) в плазме крови;
 - концентрации антимитохондриальных антител подтипа М2 (АМА-М2), ВАХ, Vc1-2, цитохрома С в плазме крови;
 - концентрации диеновых конъюгатов (ДК), малонового диальдегида (МДА) в плазме и эритроцитах, восстановленного глутатиона (GSH) в плазме крови.
2. Наборы для пункционной биопсии печени.
3. Реагенты и медицинские изделия для приготовления электронно-микроскопических препаратов (реактивы для фиксации, проводки и заливки биоптата в парафин, красители, ультрамикротом, лабораторная посуда).
4. Электронный трансмиссионный микроскоп.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

ВИЧ-инфекция.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Соответствующие таковым к биопсии печени и венепункции.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Метод состоит из 3-х последовательных этапов.

Первый этап — лабораторный мониторинг изменения активности органоспецифических маркеров повреждения гепатоцита: АлАТ, АсАТ, ГГТП, ЩФ и концентрации общего билирубина в плазме крови:

1. Определить активность органоспецифических ферментов в плазме крови (АлАТ, АсАТ, ГГТП, ЩФ).
2. При повышении активности АлАТ, АсАТ, ГГТП, ЩФ (включая сохранение повышенной активности ферментов при повторном их определении через 2 недели) в сравнении с исходными значениями (до начала приема антиретровирусных лекарственных средств) установить диагностические коэффициенты: отношение ГГТП/АсАТ и ГГТП/АлАТ; увеличение в процессе

терапии любого из них более чем на 25% от исходного значения, особенно ГГТП/АсАТ, является диагностическим критерием наличия лекарственного повреждения гепатоцитов при АРТ.

Второй этап — лабораторный мониторинг изменения показателей системы перекисного окисления липидов (ПОЛ), антиоксидантной защиты (GSH), АМА-М2, расчет коэффициента ГГТП/АМА-М2 для диагностики митохондриальной дисфункции:

1. Определить уровень АМА-М2: снижение АМА-М2 в процессе АРТ более, чем на 25% от исходного значения является неблагоприятным прогностическим признаком и свидетельствует о лизисе митохондриальных мембран (митохондриальной цитотоксичности).

2. Рассчитать коэффициент ГГТП/АМА-М2: при показателе большем или равным 28,99 — диагностируется митохондриальная дисфункция вследствие воздействия АРТ (чувствительность 0,81; специфичность 0,67; $p = 0,025$).

3. Определить показатели ПОЛ (ДК, МДА в плазме и эритроцитах) и уровень восстановленного глутатиона (GSH): повышение содержания ДК и уменьшение GSH свидетельствует об активации митохондриальных процессов генерации активных форм кислорода, имеющих место на начальных этапах запуска митохондриального пути апоптоза; следовательно, подтверждается наличие митохондриальной дисфункции.

Третий этап — лабораторный мониторинг специфических маркеров повреждения митохондрий: определение концентрации факторов митохондриального звена апоптоза (BAX, Bcl-2, цитохром C); световая и электронно-микроскопическая оценка митохондрий в прижизненном биоптате печени:

1. Определить концентрацию BAX, Bcl-2, цитохрома C в крови с интервалом 3 мес. Возрастание их концентрации в плазме крови свидетельствует о запуске митохондриального пути апоптоза в клетке и наличии цитолитического повреждения гепатоцита.

2. Провести пункционную биопсию печени, изучить биоптат с помощью световой и электронной микроскопии, включая морфометрию митохондрий. Признаками лекарственной цитотоксичности митохондрий являются: дегградация органелл, обусловленная расширением интракристичных промежутков, вплоть до локального отслоения внутренней мембраны; при морфометрии – уменьшение средней площади митохондрий менее $0,2 \text{ мкм}^2$, выраженный полиморфизм, диффузная локализация в клетках, уменьшение размеров крист (менее $0,1 \text{ мкм}$ в одной митохондрии) и изменение их структуры (пластинчатые и трубчатые).

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

При четком соблюдении рекомендованной схемы выполнения метода осложнений не наблюдается. Несоблюдение техники выполнения и последовательности этапов использования метода может исказить результаты и приводить к некорректной трактовке полученных результатов.

Основной ошибкой может быть нарушение методики забора, условий хранения, транспортировки и исследования показателей в плазме крови и эритроцитах.

Для устранения ошибок необходимо правильно производить забор крови в пластиковую вакуумную пробирку промышленного производства. Кровь при наличии микросгустков и гемолиза оценке не подлежит.

На этапе электронно-микроскопического исследования: недостаточный объем биоптата, забор только субкапсулярных участков печени, нарушение технологии приготовления микропрепаратов, анализ препаратов морфологом, не имеющим опыта ультрамикроскопической диагностики поражений печени.

название

УТВЕРЖДАЮ

Главный врач

учреждения

_____ 201__ И.О.Фамилия

здравоохранения

МП

А К Т

учета практического использования инструкции по применению

1. Инструкция по применению: «Метод лабораторной диагностики митохондриальной дисфункции при токсическом поражении печени у ВИЧ-инфицированных пациентов, получающих антиретровирусную терапию».

2. Утверждена Министерством здравоохранения Республики Беларусь 18 марта 2016 г. № 270-1215.

3. Кем предложена разработка: сотрудниками Учреждения образования «Гродненский государственный медицинский университет»: д.м.н., профессором В. М. Цыркуновым и к.м.н., доцентом М. Н. Курбатов.

4. Материалы инструкции использованы для _____

5. Где внедрено: _____

подразделение и название учреждения здравоохранения

6. Результаты применения метода за период с _____

по _____

общее кол-во наблюдений « ____ »

положительные « ____ »

отрицательные « ____ »

7. Эффективность внедрения (восстановление трудоспособности, снижение заболеваемости, рациональное использование коечного фонда, врачебных кадров и медицинской техники) _____

8. Замечания, предложения: _____

_____ 201__ Ответственные за внедрение:

Должность подпись И.О.Фамилия

Примечание: акт о внедрении направлять по адресу:

кафедра инфекционных болезней

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

ул. Горького, 80, 230009, г. Гродно