

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

\_\_\_\_\_ В.А.Ходжаев

2 февраля 2011г.

Регистрационный № 122-1110

**МЕТОД ОЦЕНКИ КИСЛОРОДНОГО ОБМЕНА ЭРИТРОЦИТОВ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

ГУ «Республиканский научно-практический центр  
неврологии и нейрохирургии»

АВТОРЫ:

д-р. биол. наук, проф. Э.П.Титовец,  
д-р. мед. наук, проф. Л.А.Смирнова,  
канд. биол. наук Л.П.Пархач

Минск 2011

В инструкции «Метод оценки кислородного обмена эритроцитов» представлена технология количественной оценки кислородного обмена эритроцитов и действия на него фармакологических средств.

### ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

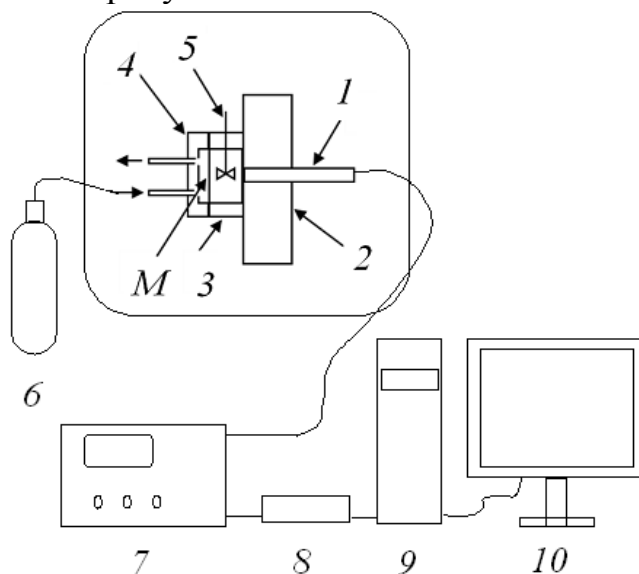
Инструкция «Метод оценки кислородного обмена эритроцитов» может быть рекомендована к использованию в лабораториях клинической диагностики центров для выявления скрытой хронической гипоксии тканей головного мозга, сердечной мышцы и др., обусловленной нарушениями транспорта кислорода через цитоплазматическую мембрану эритроцитов вследствие патологических процессов или под действием фармакологических средств.

### ПРИБОРНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ

Модульный компьютеризированный приборный комплекс для оценки кислородного обмена эритроцитов включает:

1. Полярограф с кислородным сенсором и измерительный модуль.
2. Персональный компьютер для связи с полярографом и графической регистрации кинетики содержания кислорода.
3. Программное обеспечение для обработки данных.

Пример устройства для количественной оценки кислородного обмена эритроцитов представлен на рисунке 1.



**Рис. 1. Блок-схема приборного комплекса для исследования кислородного обмена эритроцитов**

1 — кислородный сенсор; 2 — монтажный блок; 3 — камера для исследуемых эритроцитов; 4 — газообменный модуль; 5 — микромешалка; М — мембрана; 6 — баллон с азотом; 7 — полярограф; 8 — аналогово-цифровой преобразователь; 9, 10 — компьютер

## АЛГОРИТМ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования кислородного обмена эритроцитов в описанной выше открытой системе осуществляют следующим образом:

1) В измерительную камеру (3 на рис. 1) помещают буферный раствор ( $\text{NaCl}$  — 86 ммоль;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  — 21 ммоль;  $\text{NaNH}_2\text{PO}_4$  — 8,3 ммоль;  $\text{CaCl}_2$  — 10 мкмоль;  $\text{pH}$  — 7,4), уравновешенный по кислороду с атмосферным воздухом. Через газообменный модуль (4 на рис. 1) пропускают азот и получают кинетическую кривую падения парциального давления кислорода в измерительной камере. После достижения минимума парциального давления кислорода через газообменный модуль пропускают воздух. Получают кривые оксигенации-дезоксигенации кислородом раствора в области 5 кПа (рис. 2 А).

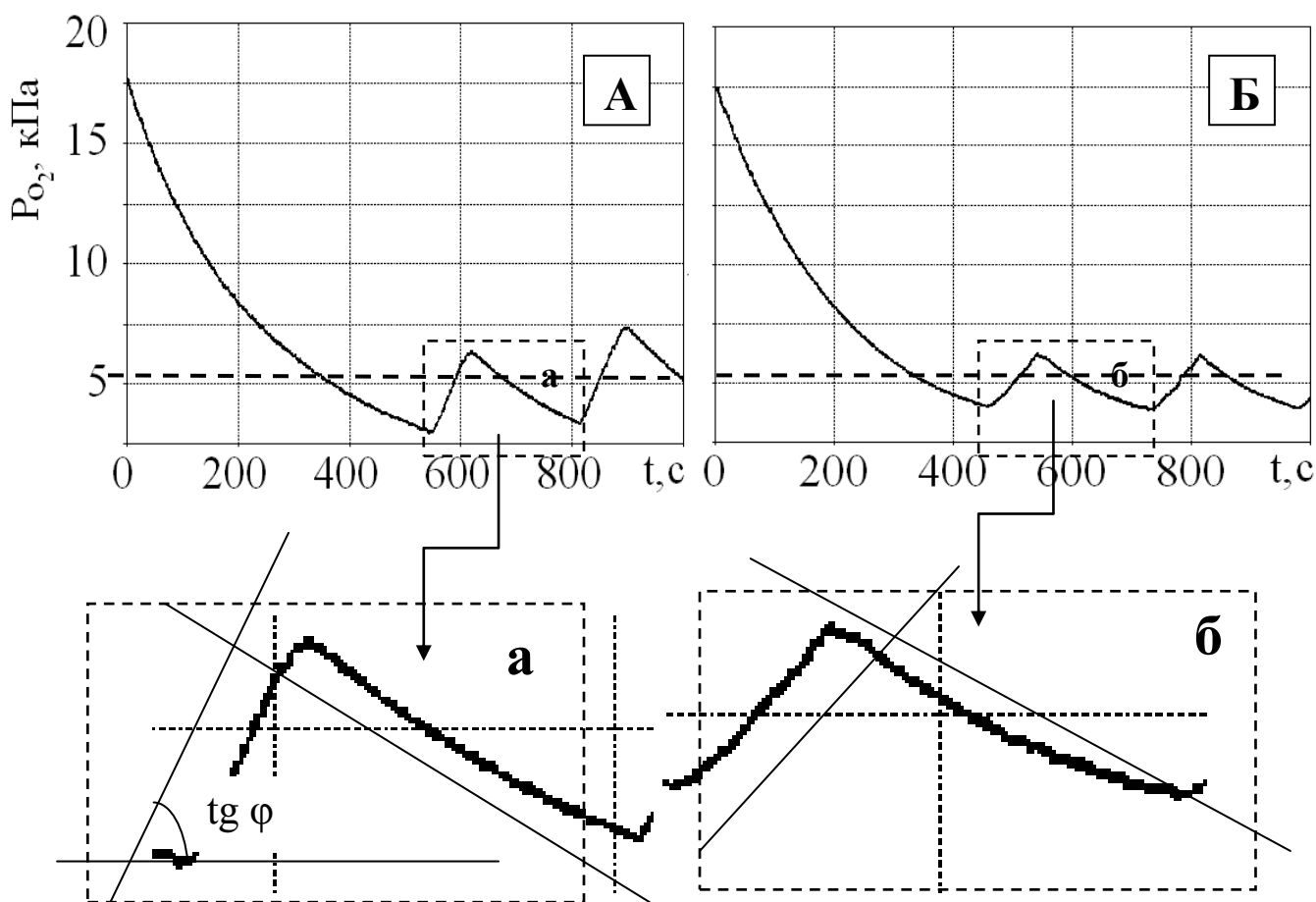


Рис. 2. Исследование кислородного обмена эритроцитов

А,а — буфер в ячейке;

Б,б — эритроциты донора Р., ресуспензированные в буфере

Рассчитывают скорости снижения и возрастания парциального давления кислорода в ячейке (определяют тангенс угла наклона кривых — рисунок 2а) при смене подаваемого в газообменный модуль газа. Полученные скорости являются калибровочными величинами для данной ячейки.

В измерительную камеру помещают эритроциты крови человека, ресуспензированные в буфере. Для исследования у пациента берут кровь из пальца в процедурном кабинете по обычной методике в количестве 0,3 мл (1 капилляр) и смешивают с 5 мл физиологического раствора (без гепарина). Эритроциты отмывают и трижды переосаждают в фосфатном буфере. Путем разбавления доводят количество эритроцитов до  $0,30 \times 10^6/\text{мкл}$  (подсчет производят на гематологическом анализаторе). Микрошприцем производят забор приготовленной суспензии и помещают ее в полярографическую камеру (3 на рис. 1).

Через газообменный модуль (4 на рис. 1) пропускают последовательно азот и воздух. Повторяют процесс пропускания газов несколько раз. Регистрируют кривые изменения парциального давления кислорода в ячейке в области 5 кПа (рис. 2 Б) при смене подаваемого газа в газообменный модуль. Определяют скорости снижения и возрастания парциального давления кислорода в ячейке с эритроцитами при смене подаваемого в газообменный модуль газа (рис. 2 б).

3) Скорость оксигенации эритроцитов получают путем вычитания из скорости поступления кислорода в измерительную камеру с буфером (калибровочная величина) (пункт 1) скорость изменения парциального давления кислорода в этой камере с эритроцитами в буферном растворе (пункт 2). Соответственно определяют скорости дезоксигенации эритроцитов.

## **ОЦЕНКА ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА КИСЛОРОДНЫЙ ОБМЕН ЭРИТРОЦИТОВ**

Метод используется для контроля кислородтранспортной функции эритроцитарной мембраны после проведения терапевтических мероприятий:

- для оценки действия фармакологических препаратов на скорость транспорта кислорода через эритроцитарную мембрану;
- для оценки действия фармакологических препаратов на кислородный обмен эритроцитов при длительном курсовом применении.

1. Для определения действия фармакологических препаратов на кислородтранспортные процессы в эритроцитарной мембране поступают следующим образом:

- а) в измерительную камеру помещают эритроциты крови донора до воздействия препарата. Определяют скорости оксигенации-дезоксигенации эритроцитов.
- б) эритроциты инкубируют с препаратом в терапевтической концентрации в течение 30 мин при температуре  $37^\circ\text{C}$ . Определяют скорости оксигенации-дезоксигенации эритроцитов после воздействия препарата *in vitro*.
- в) сравнивают полученные результаты. К снижению скоростей переноса кислорода будет приводить ингибирование препаратом систем обеспечения трансмембранного перемещения кислорода, к увеличению — их активация.

При значительном снижении кислородтранспортной функции эритроцитов применение препарата будет приводить к ишемическим нарушениям, при ее увеличении препарат можно использовать как антигипоксикант.

2. Для определения воздействия препарата на кислородный обмен эритроцитов при длительном курсовом применении применяют следующую схему:

а) в измерительную камеру помещают эритроцитарную суспензию крови пациента до начала проведения терапевтических мероприятий. Определяют скорости оксигенации-дезоксигенации эритроцитов.

б) повторяют оценку кислородтранспортной функции эритроцитов крови пациента после курсового (не менее 1 мес.) применения.

в) сравнивают полученные результаты. Снижение скоростей оксигенации будет наблюдаться в случае уменьшения под действием препарата уровня экспрессии во время эритропоэза систем, обеспечивающих трансмембранный перенос кислорода в эритроците; повышение — вследствие увеличения уровня экспрессии.

Фармакологические препараты, приводящие к увеличению скоростей оксигенации-дезоксигенации эритроцитов после курсового воздействия, могут быть использованы при лечении гипоксии и ишемии тканей головного мозга, сердечной мышцы, а также анемий различного генеза.

В мембране эритроцитов крови человека присутствует трансмембранный белок аквапорин AQP1, обеспечивающий транспорт воды, углекислого газа и кислорода. Промоторный сайт гена AQP1 включает структуру ответа на действие глюкокортикоидных гормонов, что приводит к повышению экспрессии аквапорина AQP1 в клетках. Предполагается, что длительное применение фармакологических препаратов может приводить к увеличению (снижению) экспрессии аквапорина AQP1 в мембране эритроцитов во время эритропоэза. Соответственно, изменение количества трансмембранных каналов в эритроците будет приводить к изменению скоростей кислородного обмена эритроцитов.

В зрелом эритроците синтез белка AQP1 не осуществляется. Инкубация эритроцитов крови *in vitro* с фармакологическими препаратами позволяет оценить кислородтранспортную активность уже имеющихся в плазматической мембране эритроцита трансмембранных белков AQP1, а оценка кислородного обмена эритроцитов после длительного курсового применения фармакологических препаратов — уровень экспрессии AQP1 в мембране эритроцитов.

Инструкция по применению «Метод оценки кислородного обмена эритроцитов» подтверждена положительным решением на выдачу патента «Способ исследования кислородного обмена эритроцитов» (авт. проф. Титовец Э.П.) № а 20090359 от 13.03.09, рацпредложением «Устройство и способ для исследования кислородного обмена эритроцитов» (авт. проф. Титовец Э.П.) от 26.02.09., актом о внедрении «Устройство для определения параметров кислородного обмена эритроцитов» (авт. проф. Титовец Э.П.) от 02.03.09.