

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневиц

«*17*» *августа* 2017 г.



Регистрационный № 011-0317

**МЕТОД
ВТОРИЧНОЙ МЕДИЦИНСКОЙ ПРОФИЛАКТИКИ ИШЕМИЧЕСКОЙ
БОЛЕЗНИ СЕРДЦА**

Инструкция по применению

Учреждения разработчики: Учреждение образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»

Авторы: д.м.н., доцент Осочук С.С., Марцинкевич А.Ф., Деркач И.Н., Морозов М.П.

Витебск, 2017

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод вторичной медицинской профилактики ишемической болезни сердца, который основан на определении оптимального, для трансмембранного переноса кислорода, содержания полиненасыщенных жирных кислот в мембранах эритроцитов пациентов с дислиппротеинемиями и может быть использован в комплексе медицинских услуг направленных на медицинскую профилактику ишемической болезни сердца.

Инструкция предназначена для врачей – кардиологов, врачей клинической лабораторной диагностики, врачей – терапевтов, иных специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам кардиологического профиля.

Перечень необходимых медицинских изделий, лекарственных средств, реактивов и т.д.

1. Спектрофлуориметр CM 2203 (SOLAR) или аналогичный по техническим характеристикам
2. Персональный компьютер
3. Центрифуга способная создать ускорение не хуже 30000g.
4. pH-метр.
5. Магнитная мешалка.
6. Водоструйный насос.
7. Микрошприц объемом 10 мкл
8. Вакутайнеры объемом 5 мл с 3,2 % раствором цитрата натрия.
9. Пирен (Pyrene) $\geq 99,0\%$ (GC) 1 мМоль/л в абсолютном этаноле
10. Буфер №1 для получения мембран эритроцитов (20 мМоль фосфат натрия pH 7,4)
11. Буфер №2 для проведения гемолиза эритроцитов (5 мМоль фосфат натрия pH 8,0)
12. Буфер №3 для центрифугирования суспензии эритроцитов на 1000 об./мин. (150 мМоль хлорида натрия и 5 мМоль фосфат натрия, pH 8,0)

Показания к применению

Дислиппротеинемии атерогенного типа.

Противопоказания к применению

Отсутствуют.

Описание технологии использования метода

1. Забор биологического материала.

1.1. Забор венозной крови осуществляется в утренние часы, натощак (не менее 12 часов после последнего приёма пищи) из локтевой

вены в положении пациента сидя, в вакутайнеры объёмом 5 мл с 3,2 % раствором цитрата натрия.

2. Выделение мембран эритроцитов.

2.1. Кровь с цитратом натрия центрифугируется 5 мин. 1000 об./мин., отбирается плазма, тщательно удаляется верхний слой лейкоцитов с использованием водоструйного насоса.

2.2. Оставшийся осадок эритроцитов заливается 3-х – 4-х кратным объёмом буфера № 3, аккуратно перемешивается и центрифугируется 5 мин. при 1000 об./мин., при температуре +4 °С, с тщательным удалением надосадочной жидкости водоструйным насосом. Процедура повторяется трижды.

2.3. Для получения мембран эритроцитов полученные после последнего центрифугирования упакованные эритроциты заливают 20-25-кратным объёмом буфера № 2, ресуспензируют на магнитной мешалке 15 мин. и центрифугируют 20 мин. на 15000 об./мин. (30000 g) при температуре +4 °С. Осадок получается в виде круглого пятна-налёта розового цвета на дне пробирки. Надосадочную жидкость аккуратно убирают водоструйным насосом, заливают 20-кратным объёмом буфера № 2 и повторяют центрифугирование при тех же условиях. Процедуру отмывки осадка проводят дважды.

2.4. Для отмывки мембран эритроцитов полученный осадок ресуспензируют и центрифугируют по 20 мин. на 15000 об./мин. (30 000 g) при температуре +4 °С, заливая осадок буфером № 1. Процедуру отмывки повторяют дважды. После центрифугирований пятно мембран заливают 3 мл буфера № 1, ресуспензируют мембраны пипеткой и переливают в стеклянный флакон объёмом 5 мл.

2.5. Перед исследованием раствора мембран на спектрофлуориметре, их разводят буферным раствором №1, таким образом, чтобы объём раствора мембран составлял не менее 2 мл, а конечная концентрация белка в пробе равнялась 100 мкг/мл.

3. Измерение показателей физико-химических свойств мембран эритроцитов.

3.1. Для определения физико-химических свойств мембран эритроцитов, помещают 2 мл раствора мембран с конечной концентрацией белка 100 мкг/мл в 4-х стороннюю кварцевую кювету размером 1,2×1,2 см и длиной оптического пути 1 см.

3.2. В кювету с суспензией мембран вносят 2 мкл пирена (1мкМ) и инкубируют зонд с мембранами при постоянном встряхивании ~5-10 мин. на магнитной мешалке.

3.3. Измеряют интенсивность флуоресценции мембран эритроцитов при длине волны возбуждения $\lambda_{\text{возб.}}=286$ нм, оценивая испускание при длинах волн $\lambda_{\text{рег.}}=374$ нм (первый вибронный пик мономеров пирена) и 394 нм (второй вибронный пик мономеров пирена), регистрируя показатели как I_{A1m1} и I_{A1m3} .

3.4. Измеряют интенсивность флуоресценции мембран эритроцитов при длине волны возбуждения $\lambda_{\text{возб.}}=337$ нм, оценивая испускание при длинах волн $\lambda_{\text{рег.}}=374, 394$ и 470 нм (эксимеры пирена), регистрируя показатели как $I_{G1m1}, I_{G1m3}, I_{G1e}$.

3.5. Вносят 18 мкл пирена (10 мкМ), инкубируют зонд с мембранами и оставляют при постоянном встряхивании на 5-10 мин. на магнитной мешалке.

3.6. Измеряют интенсивность флуоресценции мембран эритроцитов при длине волны возбуждения $\lambda_{\text{возб.}}=286$ нм, оценивая испускание при длинах волн $\lambda_{\text{рег.}}=374$ и 394 нм, регистрируя показатели как I_{A10m1} и I_{A10m3} .

3.7. Измеряют интенсивность флуоресценции мембран эритроцитов при длине волны возбуждения $\lambda_{\text{возб.}}=337$ нм, оценивая испускание при длинах волн $\lambda_{\text{рег.}}=374, 394$ и 470 нм, регистрируя показатели как $I_{G10m1}, I_{G10m3}, I_{G10e}$.

3.8. Затем рассчитывают следующие показатели:

3.8.1. Микровязкость мембран эритроцитов в зоне приобелковых взаимодействий и в зоне общего липидного пула при концентрациях пирена 1 мкМ рассчитывают как отношение I_{A1m1}/I_{A1e} (MVA1) и I_{G1m1}/I_{G1e} (MVG1) соответственно.

3.8.2. Микровязкость мембран эритроцитов в зоне приобелковых взаимодействий и в зоне общего липидного пула при концентрациях пирена 10 мкМ рассчитывают как отношение I_{A10m1}/I_{A10e} (MVA10) и I_{G10m1}/I_{G10e} (MVG10) соответственно.

3.8.3. Микрополярность мембран эритроцитов в зоне приобелковых взаимодействий и в зоне общего липидного пула при концентрации пирена 1 мкМ рассчитывают как отношение I_{A1m1}/I_{A1m3} (MPA1) и I_{G1m1}/I_{G1m3} (MPG1) соответственно.

3.8.4. Микрополярность мембран эритроцитов в зоне приобелковых взаимодействий и в зоне общего липидного пула при концентрации пирена 10 мкМ рассчитывают как отношение I_{A10m1}/I_{A10m3} (MPA10) и I_{G10m1}/I_{G10m3} (MPG10) соответственно.

4. Обработка полученных результатов.

4.1. Концентрацию жирных кислот рассчитывают согласно следующим формулам:

4.1.1. Олеиновая кислота (C18:1, мкг/мл):

$$c(C18:1) = 2,270 - 0,1633 \times MVG1 + 6,630 \times MPG1 - 6,21 \times MPG10 - 0,767 \times MPG1 \times MPA1 + 0,1545 \times MVG1 \times MPG10$$

4.1.2. Линоленовая кислота (C18:3, мкг/мл):

$$c(C18:3) = 0,9294 - 0,0649 \times MVG1 + 2,917 \times MPG1 \times MPA10 + 0,0608 \times MVG1 \times MPG10 - 3,099 \times MPA10 \times MPG10$$

4.1.3. Арахидоновая кислота (C20:4, мкг/мл):

$$c(C20:4) = 0,6878 - 0,3325 \times MVA10 - 1,272 \times MPA1 + 1,672 \times MPG1 + 0,00127 \times MVA10 \times MVG1 + 1,435 \times MPA1 \times MPA10 + 0,2597 \times MVA10 \times MPG10 - 2,044 \times MPA10 \times MPG10$$

4.2. Оптимальное содержание ПНЖК (ОПТ_{ПНЖК}) рассчитывают по следующей формуле:

$$\text{ОПТ}_{\text{ПНЖК}} = \frac{1}{1+e^{-x}} \times 100\%,$$

$$\text{где } x = -58,57 + 36,35 \times c(C18:1) + 79,82 \times c(C18:3) - 58,91 \times c(C18:1) \times c(C18:3) + 39,50 \times c(C18:3) \times c(C20:4), e - \text{основание натурального логарифма (2,718)}.$$

Полученный результат представляет собой оценку оптимального для трансмембранного переноса кислорода содержания ПНЖК в мембранах эритроцитов, выраженного в процентах.

Нижним значением оптимального диапазона содержания ПНЖК следует считать 47,74%, верхним – 93,39%.

5. Принятие уровня решения

5.1 При значениях ниже 47,74%, следует увеличить потребление эссенциальных жирных кислот с пищей или биологически активными добавками.

5.2 При значениях выше 93,39%, следует снизить потребление эссенциальных жирных кислот с пищей или биологически активными добавками.

6. Возможные осложнения и ошибки

1. Забор крови в период до 12 часов после приема пищи.
2. Забор крови из кубитальной вены в положении пациента лежа.
3. Забор крови в пластиковые одноразовые шприцы.