

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра
Д.Л. Пиневич
«14» *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

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневиц
14.04.2017
Регистрационный № 011-0317

**МЕТОД ВТОРИЧНОЙ МЕДИЦИНСКОЙ ПРОФИЛАКТИКИ
ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: УО «Витебский государственный ордена
Дружбы народов медицинский университет»

АВТОРЫ: д-р мед. наук, доц. С.С. Осочук, А.Ф. Марцинкевич, И.Н. Деркач,
М.П. Морозов

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 дислипотеинемиями 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 НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

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

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Дислипотеинемии атерогенного типа.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

1. Забор биологического материала

Забор венозной крови осуществляется в утренние часы, натощак (не менее 12 ч после последнего приема пищи) из локтевой вены в положении пациента сидя, в вакутайнеры объемом 5 мл с 3,2%-м раствором цитрата натрия.

2. Выделение мембран эритроцитов

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

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

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

2.3. Для отмывки мембран эритроцитов полученный осадок ресуспензируют и центрифугируют по 20 мин на 15000 об./мин (30000 g) при температуре +4°C, заливая осадок буфером № 1. Процедуру отмывки повторяют дважды. После центрифугирования пятно мембран заливают 3 мл буфера № 1, ресуспензируют мембраны пипеткой и переливают в стеклянный флакон объемом 5 мл.

2.4. Перед исследованием раствора мембран на спектрофлуориметре, их разводят буферным раствором № 1 таким образом, чтобы объем 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, следует поместить 2 мл раствора мембран с конечной концентрацией белка 100 мкг/мл в 4-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 (1 мкМ) 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 прибрежковых 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 прибрежковых 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 прибрежковых 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 прибрежковых 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):

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

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

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

4.2. Оптимальное содержание ПНЖК ($OPT_{\text{ПНЖК}}$) рассчитывают по следующей формуле:

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

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

e — основание натурального логарифма (2,718).

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

Нижним граничным значением 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.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

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