УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **147022** (13) **U**

(51) МПК
C12Q 1/54 (2006.01)
G01N 1/28 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО "УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2020 05812**
(22) Дата подання заявки: **10.09.2020**
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: **08.04.2021**
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: **07.04.2021, Бюл.№ 14**

(72) Винахідник(и):
Шпакова Наталія Михайлівна (UA),
Чабаненко Олена Олексіївна (UA),
Орлова Наталія Вікторівна (UA)

(73) Володілець (володільці):
ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ,
вул. Переяславська, 23, м. Харків, 61016 (UA)

(54) СПОСІБ ЗНИЖЕННЯ ПОСТГІПЕРТОНІЧНОГО ГЕМОЛІЗУ ЕРИТРОЦИТІВ ЛЮДИНИ

(57) Реферат:

Спосіб зниження постгіпертонічного гемолізу еритроцитів людини включає інкубацію еритроцитів у середовищі дегідратації, з подальшою інкубацією в середовищі регідратації, що містить антигемолітичну речовину, згідно з корисною моделлю, як антигемолітичну речовину використовують трифторперазин в концентрації 150 мкМ або децил-β,D-глюкопіранозид в концентрації 1000 мкМ, а інкубацію в середовищах дегідратації та регідратації еритроцитів здійснюють при температурі 0 °С.

UA 147022 U

Корисна модель належить до галузі кріобіології і кріомедицини і може бути використана для корекції стану клітин в умовах постгіпертонічного шоку [1] та моделювання умов розморожування біологічних об'єктів.

Відомий спосіб зниження постгіпертонічного гемолізу еритроцитів людини, який включає інкубацію еритроцитів у середовищі дегідратації і регідратації, з додаванням антигемолітичної речовини - низькомолекулярного вуглеводу (рафіноза, сахароза, манітол) в концентрації 0,1 М [2].

Недоліком вказаного способу є використання антигемолітичної речовини у високій концентрації, що може призводити до підвищення осмоляльності середовища регідратації.

Найбільш близьким до способу, що заявляється, є спосіб зниження постгіпертонічного гемолізу еритроцитів людини, який включає інкубацію еритроцитів у середовищі дегідратації (1,5 М NaCl, 5 мМ фосфатний буфер, pH 7,4) протягом 15 хв., при 37 °С, з подальшим перенесенням у середовище регідратації (0,15 М NaCl, 10 мМ трис-HCl буфер, pH 7,4), що містить антигемолітичну речовину - катіони кальцію (100 мМ), і інкубацію протягом 5 хв при кімнатній температурі (18-20 °С) [3].

Основними недоліками цього способу є недостатній рівень зниження (в 1,7 разу) постгіпертонічного гемолізу еритроцитів та низька відтворюваність результатів, внаслідок здійснення способу при кімнатній температурі, та використання катіонів кальцію. Крім цього, спосіб є складним, що пов'язано з використанням двох різних температур (37 °С і кімнатна температура) та етапів інкубації, що потребує додаткового обладнання (термостати) і маніпуляцій з клітинами (перенос еритроцитів з одного термостата в другий).

Задачею корисної моделі є створення такого способу зниження постгіпертонічного гемолізу еритроцитів людини, в якому би, шляхом заміни антигемолітичної речовини в середовищі регідратації та зміни температурного режиму етапів інкубації, забезпечувалася можливість більш значного зниження постгіпертонічного гемолізу еритроцитів з одночасним підвищенням відтворюваності результатів, а також спрощення способу.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі зниження постгіпертонічного гемолізу еритроцитів людини, який включає інкубацію еритроцитів у середовищі дегідратації, з подальшою інкубацією в середовищі регідратації, що містить антигемолітичну речовину, згідно з корисною моделлю, як антигемолітичну речовину використовують трифторперазин у концентрації 150 мкМ або децил-β,D-глюкопіранозид у концентрації 1000 мкМ, а інкубацію в середовищах дегідратації та регідратації еритроцитів здійснюють при температурі 0 °С.

Використання трифторперазину або децил-β,D-глюкопіранозиду, які відносяться до групи амфіфілів, замість катіонів кальцію, та проведення інкубації при температурі 0 °С дозволяють підвищити рівень зниження постгіпертонічного гемолізу еритроцитів в 1,6 раза та забезпечити більш високу відтворюваність результатів. Проведення інкубації еритроцитів в середовищах дегідратації та регідратації при однаковій температурі дозволяє уникнути застосування додаткового обладнання і маніпуляцій з клітинами.

Спосіб здійснюють таким чином.

Антигемолітичну речовину, приготовану на фосфатному буфері (5 мМ, pH 7,4), додають у кількості 10 мкл до 1 мл середовища регідратації, що містить 0,15 М NaCl і 5 мМ фосфатного буфера, при 0 °С. Еритроцити, тричі відмиті фізіологічним розчином, додають до середовища дегідратації, яке містить 1,65 М NaCl і 5 мМ фосфатного буфера, та інкубують при температурі 0 °С протягом 20 хв. Далі аліквоту (50 мкл) з середовища дегідратації переносять у середовище регідратації, що містить 0,15 М NaCl, 5 мМ фосфатного буфера і антигемолітичну речовину - трифторперазин (150 мкМ) або децил-β,D-глюкопіранозид (1000 мкМ), та інкубують при температурі 0 °С протягом 5 хв., (кінцевий гематокрит 0,4 %). Після інкубації центрифугують і визначають рівень постгіпертонічного гемолізу еритроцитів.

Приклад 1

Еритроцити донорської крові тричі відмивали фізіологічним розчином (150 мМ NaCl, 5 мМ фосфатний буфер, pH 7,4) від плазми і формених елементів шляхом центрифугування при 1000 g протягом 3 хв., і зберігали у вигляді осаду при 0 °С не більш 2 годин. Осад еритроцитів (100 мкл) додавали до 1 мл середовища дегідратації, що містило 1,65 М NaCl і 5 мМ фосфатного буфера, та інкубували при 0 °С протягом 20 хв. Далі аліквоту (50 мкл) інкубували 5 хв., при температурі 0 °С в середовищі регідратації (0,15 М NaCl, 5 мМ фосфатний буфер), в яке заздалегідь вносили антигемолітичну речовину - трифторперазин із розрахунку 10 мкл на 1 мл розчину (кінцевий гематокрит 0,4 %). Кінцева концентрація трифторперазину в середовищі регідратації складала 150 мкМ. Контролем були еритроцити, перенесені при 0 °С на 20 хв., у середовище дегідратації, що містило 1,65 М NaCl і 5 мМ фосфатного буфера, а потім на 5 хв., у середовище регідратації, що не містило трифторперазину. Після інкубації проби

центрифугували і визначали рівень постгіпертонічного гемолізу еритроцитів методом спектрофотометрії [4].

Рівень постгіпертонічного гемолізу еритроцитів людини становив без трифторперазину 74±7 %, у присутності трифторперазину - 27±5 %.

Приклад 2.

Спосіб здійснювали аналогічно Прикладу 1, за винятком того, що як антигемолітичну речовину в середовищі регідратації використовували децил-β,D-глюкопіранозид у кінцевій концентрації 1000 мкМ.

Рівень постгіпертонічного гемолізу еритроцитів людини становив без децил-β,D-глюкопіранозиду 74±7 %, у присутності децил-β,D-глюкопіранозиду - 26±5 %.

Результати наведені в Таблиці 1. З даних Таблиці 1 видно, що після використання трифторперазину і децил-β,D-глюкопіранозиду зниження рівня постгіпертонічного гемолізу еритроцитів людини більш значне (в 2,7-2,8 разу), ніж при застосуванні катіонів кальцію (в 1,7 разу). З даних Таблиці 1 також видно, що у заявленому способі стандартне відхилення рівня постгіпертонічного гемолізу еритроцитів становить 4-7 %, що свідчить про високу відтворюваність результатів.

Приклад 3.

Спосіб здійснювали аналогічно Прикладу 1, за винятком того, що використовували різні концентрації трифторперазину і децил-β, D-глюкопіранозиду. Результати наведені в Таблиці 2. З даних Таблиці 2 видно, що оптимальними концентраціями трифторперазину є 150 мкМ, а децил-β, D-глюкопіранозиду - 1000 мкМ. При значеннях концентрацій речовин вище або нижче оптимальних отримано більш високий рівень постгіпертонічного гемолізу еритроцитів.

Таблиця 1

Рівень постгіпертонічного гемолізу еритроцитів людини (n=10)

Спосіб	Антигемолітична речовина	Концентрація, мкМ	Гемоліз, %	А/Б
Заявлений	контроль	0	74±7	-
	трифторперазин	150	27±5	2,7
	децил-β, D-глюкопіранозид	1000	26±4	2,8
Прототип	контроль	0	47	-
	Ca^{2+}	100000	27	1,7

Примітка: А - гемоліз контрольних еритроцитів, Б - гемоліз еритроцитів у присутності антигемолітичної речовини.

Таблиця 2

Рівень постгіпертонічного гемолізу еритроцитів людини (n=10)

Трифторперазин		Децил-β, D-глюкопіранозид	
Концентрація, мкМ	Гемоліз, %	Концентрація, мкМ	Гемоліз, %
50	37	600	30
100	30	800	28
150	27	1000	26
200	29	1200	29
250	35	1400	33

Джерела інформації:

1. Божок Г.А. Структурные детерминанты объемных изменений эритроцитов в условиях постгипертонического и яд-индуцированного лизиса //Проблемы криобиологии.-1996. - №. 3. - С. 16-22.

2. Zade-Oppen A.M.M. The effect of mannitol, sucrose, raffinose and dextran on posthypertonic hemolysis //Acta Physiol. Scand. -1968. - Vol. 74, № 1-2. - P. 195-206.

3. Пателарос С.В. Влияние моновалентных катионов Na^+, K^+, H^+ на развитие осмотических мембранных повреждений эритроцитов, активируемых ионами Ca^{++} и Zn^{++} //Проблемы криобиологии. - 1998. - №. 4. - С. 26-31.

4. Чабаненко Е.А., Орлова Н.В., Шпакова Н.М. Реакция эритроцитов на изменение температурно-осмотических условий среды в присутствии глицерина //Доповіді Національної академії наук України. - 2019. - № 2. - С. 84-89.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб зниження постгіпертонічного гемолізу еритроцитів людини, який включає інкубацію еритроцитів у середовищі дегідратації, з подальшою інкубацією в середовищі регідратації, що містить антигемолітичну речовину, який **відрізняється** тим, що як антигемолітичну речовину використовують трифторперазин в концентрації 150 мкМ або децил-β,D-глюкопіранозид в концентрації 1000 мкМ, а інкубацію в середовищах дегідратації та регідратації еритроцитів здійснюють при температурі 0 °С.

Комп'ютерна верстка Л. Литвиненко

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601