

**ОПИСАНИЕ  
ИЗОБРЕТЕНИЯ  
К ПАТЕНТУ**

(12)

РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ



НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР  
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ  
СОБСТВЕННОСТИ

(19) **ВУ** (11) **23975**

(13) **С1**

(46) **2023.04.30**

(51) МПК

**G 09B 23/28** (2006.01)

(54)

**СПОСОБ СНИЖЕНИЯ СРОДСТВА ГЕМОГЛОБИНА  
К КИСЛОРОДУ**

(21) Номер заявки: а 20210210

(22) 2021.07.09

(43) 2023.02.28

(71) Заявитель: Учреждение образования "Гродненский государственный медицинский университет" (ВУ)

(72) Авторы: Зинчук Виктор Владимирович; Билецкая Елена Степановна (ВУ)

(73) Патентообладатель: Учреждение образования "Гродненский государственный медицинский университет" (ВУ)

(56) ЗИНЧУК В.В. и др. Эффект озона на кислородтранспортную функцию крови при различных режимах воздействия в опытах *in vitro*. Биофизика, 2020, т. 65, № 5, с. 915-919.

ЗИНЧУК В.В. и др. Коррекция кислородтранспортной функции крови при патологии сердечно-сосудистой системы. Гродно: ГрГМУ, 2016, с. 62-79.

БИЛЕЦКАЯ Е.С. и др. Изменение кислородтранспортной функции крови в условиях коррекции L-аргинин-NO системы при действии озона. Актуальные вопросы физиологии, сборник материалов научно-практической конференции. Гродно: ГрГМУ, 2019, с. 55-57.

RU 2061479 C1, 1996.

US 5661182 A, 1997.

US 2016/0331783 A1.

(57)

Способ снижения сродства гемоглобина к кислороду *in vitro*, заключающийся в том, что пробу крови объемом 3 мл на протяжении 30 мин обрабатывают в термостатируемом сатураторе дезоксигенирующей газовой смесью, состоящей из 5,5 % CO<sub>2</sub> и 94,5 % N<sub>2</sub>, затем добавляют в пробу крови 1,0 мл озонированного изотонического раствора хлорида натрия с концентрацией озона 6 мг/л и 0,1 мл раствора нитроглицерина с концентрацией 0,05 ммоль/л, после чего пробу крови перемешивают и инкубируют на протяжении 60 мин.

Изобретение относится к области клинической и фундаментальной физиологии дыхания и может быть использовано для снижения сродства гемоглобина к кислороду.

Гипоксия представляет собой опасный патологический процесс, который является причиной возникновения широкого спектра заболеваний. Длительное воздействие гипоксии приводит к истощению приспособительных защитных реакций, и наступает декомпенсация, которая может вызывать полиорганную недостаточность [1]. Известно, что

**ВУ 23975 С1 2023.04.30**

гемоглобин, изменяя свое сродство к кислороду, влияет на кислородсвязывающие свойства крови, регулируя процессы оксигенации и дезоксигенации в микроциркуляции малого и большого кругов кровообращения [2]. Вопрос улучшения оксигенации тканей за счет снижения сродства гемоглобина к кислороду остается актуальным для практической медицины.

Известно, что использование пероксинитрита в качестве модификатора кислородсвязывающих свойств крови может приводить к уменьшению сродства гемоглобина к кислороду [3].

Недостатками данного средства являются развитие окислительного стресса из-за генерации большого количества свободных радикалов, цитотоксическое действие на ткани, а также сложность его синтеза [4].

Известно использование модификаторов аллостерического гемоглобина, которые способствуют снижению сродства гемоглобина к кислороду [5].

Недостатком является то, что данные соединения вызывают системные побочные эффекты, в частности лихорадочные и гемолитические трансфузионные реакции, риск передачи инфекционных заболеваний, а также отсутствие точной информации о том, какие модификаторы и в каких концентрациях используются.

Также известен способ снижения сродства гемоглобина к кислороду, включающий применение фталида, который выступает в качестве аналога 2,3-дифосфоглицериновой кислоты [6].

Недостатком данного способа является то, что данный препарат сдвигает вправо кривую диссоциации оксигемоглобина менее выражено в сравнении с предлагаемым нами способом, а также является более трудоемким в исполнении.

Задачей данного изобретения является расширение арсенала способов снижения сродства гемоглобина к кислороду и модификации механизмов транспорта кислорода, что позволяет разрабатывать новые методики по коррекции гипоксических состояний в клинической практике.

Поставленная задача решается тем, что *in vitro* пробу крови объемом 3 мл на протяжении 30 мин обрабатывают в термостатируемом сатураторе дезоксигенирующей газовой смесью, состоящей из 5,5 % CO<sub>2</sub> и 94,5 % N<sub>2</sub>, затем добавляют в пробу крови 1,0 мл озонированного изотонического раствора хлорида натрия с концентрацией озона 6 мг/л и 0,1 мл раствора нитроглицерина с концентрацией 0,05 ммоль/л, после чего пробу крови перемешивают и инкубируют на протяжении 60 мин.

Способ выполняют следующим образом. 3 мл крови *in vitro* обрабатывают дезоксигенирующей газовой смесью, состоящей из 5,5 % CO<sub>2</sub> и 94,5 % N<sub>2</sub> [7], в термостатируемом сатураторе в течение 30 мин. Затем добавляют озонированный изотонический раствор хлорида натрия с концентрацией O<sub>3</sub> 6 мг/л в объеме 1,0 мл и 0,1 мл раствора нитроглицерина в конечной концентрации 0,05 ммоль/л, после чего пробу крови перемешивают и инкубируют в течение 60 мин.

В результате достигается снижение сродства гемоглобина к кислороду, проявляющееся в росте показателя p50<sub>реал</sub>.

Время обработки крови дезоксигенирующей газовой смесью в термостатируемом сатураторе в течение 30 мин и время инкубации 60 мин было подобрано экспериментальным путем.

Приводим доказательства возможности осуществления заявляемого способа.

Образцы крови (n = 10) разделили на 4 группы по 3 мл. В первую контрольную группу добавляли 1,1 мл изотонического раствора хлорида натрия.

Кровь 2 группы обрабатывали дезоксигенирующей газовой смесью (5,5 % CO<sub>2</sub>; 94,5 % N<sub>2</sub>) [7] в термостатируемом сатураторе на протяжении 30 мин и добавляли 1,1 мл изотонического раствора хлорида натрия.

## BY 23975 C1 2023.04.30

Кровь 3 группы обрабатывают дезоксигенирующей газовой смесью в термостатируемом сатураторе на протяжении 30 мин и добавляют озонированный изотонический раствор хлорида натрия с концентрацией  $O_3$  6 мг/л в объеме 1 мл и 0,1 мл изотонического раствора хлорида натрия. Изотонический раствор барботируется озонкислородной смесью при помощи озонотерапевтической установки УОТА-60-01-Медозон (Россия), в которой предусмотрено измерение концентрации озона оптическим методом в ультрафиолетовом диапазоне.

Кровь 4 группы обрабатывают дезоксигенирующей газовой смесью в термостатируемом сатураторе на протяжении 30 мин и добавляют озонированный изотонический раствор хлорида натрия с концентрацией  $O_3$  6 мг/л в объеме 1 мл и 0,1 мл раствора, содержащего нитроглицерин в конечной концентрации 0,05 ммоль/л, после чего каждую пробу перемешивают и инкубируют на протяжении 60 мин.

Показатели кислородтранспортной функции крови определяли на газоанализаторе в термостатируемых условиях: парциальное давление кислорода ( $pO_2$ ), степень оксигенации ( $SO_2$ ), парциальное давление углекислого газа ( $pCO_2$ ), концентрация водородных ионов (pH). Сродство гемоглобина к кислороду оценивали спектрофотометрическим методом по показателю  $p50_{реал}$  ( $pO_2$  крови при 50 % насыщении ее кислородом). По формулам Severinghaus рассчитывали значение  $p50_{станд}$  и положение кривой диссоциации оксигемоглобина. Все показатели проверяли на соответствие признака закону нормального распределения с использованием критерия Шапиро-Уилка. С учетом этого используется непараметрическая статистика с применением программы "Statistica 10.0". Сравнение трех и более независимых групп проводят с помощью рангового дисперсионного анализа Крускала-Уоллиса. Достоверность полученных данных с учетом размеров малой выборки, множественных сравнений оценивают с использованием U-критерия Манна-Уитни. При проведении парных сравнений уровней показателей внутри групп при повторных измерениях используют критерий Вилкоксона. Результаты представлены как медиана (Me), 25-й и 75-й квартильный размах. Уровень статистической значимости принимают за  $p < 0,05$ .

В таблице представлены данные о характере изменения кислородтранспортной функции крови под воздействием озона в условиях обработки дезоксигенирующей газовой смесью и добавления нитроглицерина.

### Эффект озона на кислородтранспортную функцию крови при добавлении нитроглицерина в гипоксических условиях

Показатель	Контроль	Дезоксигенация	Дезоксигенация + озон	Дезоксигенация + нитроглицерин + озон
n	10	10		10
$p50_{реал}$ , мм рт. ст.	26,8 [25,5; 27,9]	22,2 [19,5; 24,3]*	26,44 [25,27; 27,58]#	31,5 [30,6; 39,0]*##\$
$p50_{станд}$ , мм рт. ст.	26,5 [25,4; 27,7]	21,6 [21; 23,8]*	24,50 [24,00; 26,10]*#	27,1 [26,9; 35,3]*##\$
$SO_2$ , %	31,4 [25,3; 31,7]	18,1 [15,2; 23,1]*	28,00 [24,10; 32,40]#	34,0 [32,80; 36,10]*##\$
$pO_2$ , мм рт. ст.	20,5 [18,8; 20,7]	14,9 [14,3; 15]*	21,00 [18,80; 23,20]#	24,4 [20,9; 33,9]*##\$
pH, ед	7,417 [7,411; 7,418]	7,286 [7,261; 7,304]*	7,285 [7,264; 7,302]*	7,287 [7,268; 7,323]*
$pCO_2$ , мм рт. ст.	34,2 [31,7; 36,8]	57,0 [54,6; 59,1]*	54,35 [51,00; 58,90]*	51,8 [50,4; 53,7]*#

Примечание: изменения в сравнении с группами: контрольной (\*), дезоксигенация (#), дезоксигенация + озон (\$).

Воздействие дезоксигенирующей газовой смесью (5,5 % CO<sub>2</sub>; 94,5 % N<sub>2</sub>) приводит к росту pCO<sub>2</sub> и уменьшению pH крови, способствует снижению показателей кислород-транспортной функции крови, таких как pO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>, в сравнении с контрольной группой. Показатель сродства гемоглобина к кислороду p50<sub>реал</sub> при этом снижается с 26,8 [25,5; 27,9] до 22,2 [19,5; 24,3] (p < 0,05) мм рт. ст., отражая сдвиг кривой диссоциации оксигемоглобина влево. Также наблюдается уменьшение p50<sub>станд</sub> с 26,5 [25,4; 27,7] до 21,6 [21; 23,8] (p < 0,05) мм рт. ст. Проведение предварительной дезоксигенации в условиях добавления озона приближает показатели pO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> и p50<sub>реал</sub> к значениям контрольной группы. Добавление нитроглицерина и озонированного изотонического раствора хлорида натрия в условиях предварительной дезоксигенации способствует увеличению pO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> в сравнении с группой, в которой была проведена предварительная дезоксигенация с добавлением озонированного изотонического раствора хлорида натрия. Показатель p50<sub>реал</sub> возрастает с 26,44 [25,27; 27,58] до 31,5 [30,6; 39,0] (p < 0,05) мм рт. ст., что отражает сдвиг кривой диссоциации оксигемоглобина вправо и доказывает эффективность применения в гипоксических условиях комбинации озонированного изотонического раствора хлорида натрия и нитроглицерина с целью снижения сродства гемоглобина к кислороду.

Таким образом, предварительная обработка крови дезоксигенирующей газовой смесью уменьшает показатели кислородтранспортной функции крови (pO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>, p50<sub>реал</sub>) в сравнении с контрольной группой. Введение нитроглицерина и озонированного изотонического раствора хлорида натрия в условиях предварительной дезоксигенации вызывает рост показателя p50<sub>реал</sub>, что свидетельствует о снижении сродства гемоглобина к кислороду.

Таким образом, предварительная обработка проб крови дезоксигенирующей газовой смесью, введение озонированного изотонического раствора хлорида натрия и добавление раствора нитроглицерина предлагается использовать в качестве модификатора кислород-связывающих свойств крови, который приводит к снижению сродства гемоглобина к кислороду и, соответственно, к сдвигу кривой диссоциации оксигемоглобина вправо.

#### Источники информации:

1. DARBY I.A. et al. Hypoxia in tissue repair and fibrosis. *Cell Tissue Res.* 2016, V. 365, № 3, p. 553-62. doi: 10.1007/s00441-016-2461-3.
2. YUDIN J. et al. How we diagnose and manage altered oxygen affinity hemoglobin variants. *Am J Hematol.* 2019, V. 94, № 5, p. 597-603. doi: 10.1002/ajh.25425.
3. BY 19663, 2015.
4. СТАРОДУБЦЕВА М.Н. Пероксинитрит в физиологии и патологии клеток крови. Москва: Книжный дом "Либроком", 2011, с. 130-149.
5. EP 1468680, 2004.
6. CN 107184575, 2017.
7. ЗИНЧУК В.В. и др. NO-зависимые механизмы внутриэритроцитарной регуляции сродства гемоглобина к кислороду: монография. Под ред. В.В. Зинчука. Гродно: ГрГМУ, 2016, с. 78-86.