



УКРАЇНА

(19) UA (11) 46633 (13) U  
(51) МПК (2009)  
C12N 9/50  
C12N 9/64

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

### (54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ МАТРИКСНОЇ МЕТАЛОПРОТЕЇНАЗИ-2

1

(21) u200908087  
(22) 31.07.2009  
(24) 25.12.2009  
(46) 25.12.2009, Бюл.№ 24, 2009 р.  
(72) ВОВЧУК ІРИНА ЛЕОНІДІВНА  
(73) ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМ. І.І. МЕЧНИКОВА  
(57) Спосіб визначення активності матриксної металопротеїнази-2 (ММП-2), який полягає в тому, що ММП-2 екстрагують з тканини, потім активність ММП-2, що міститься у супернатанті тканини, ви-

2

значають за гідролізом білкового субстрату при температурі 37°C за певний час, а продукти гідролізу визначають колориметричним методом, який відрізняється тим, що супернатант тканини, що містить ММП-2, в об'ємі 0,1-0,2мл інкубують з 0,4-0,8мл розчину желатину на NaCl на водяній бані протягом 30-45хв. без попередньої активації амінофеншмеркуріацетатом, потім продукти реакції визначають на спектрофотометрі при довжині хвилі 570нм.

Корисна модель відноситься до галузі визначення активності ферментів і може бути використана як додатковий метод в диференційній діагностиці пухлин та для оцінки деструктивного (інвазивного) потенціалу пухлинної тканини. Пропонується метод визначення активності матриксної металопротеїнази-2 може бути використаний також для визначення розмірів операційного поля у разі хірургічного втручання.

Матриксна металопротеїназа-2 (КФ 3.4.24.24, ММП-2, металопротеїназа-2, колагеназа IV типу, желатиназа А) відноситься до родини цинкових кальцій-залежних металопротеїназ, функція яких пов'язана з обміном білків сполучно-тканинного матриксу.

Особливе значення приділяється визначенню активності цієї протеїнази за наявності пухлинного процесу [Goffin F., Munaut C, Francine F. et al. Expression pattern of metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in cycling human endometrium. - 2003. - Biol. Reprod. - Vol. 69, №3. - P.976-984; Park Y.H., Ryu H.S., Choi D.S. et al. Effects of hepatocyte growth factor on the expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors during the endometrial cancer invasion in a three-dimensional coculture. - 2003. - Int. J. Gynecol. Cancer. - Vol. 13, №1. - P.53-60; Di Nezza L.A., Jobling T., Salomonsen L.A. Progesterin suppresses matrix metalloproteinase production in endometrial cancer. - 2003. - Gynecol. Oncol. - Vol. 89, №2. - P.325-333].

Досягнутий рівень в даній галузі ілюструється наступними прикладами.

Відомий спосіб визначення активності ММП-2, який полягає в тому, що в якості субстрату використовують MCA-Pro-Leu-Gly-Leu-DPA-Ala-Arg-NH<sub>2</sub>. Активність ферменту виражають у мкмоль метілкумаріламиду на літр за годину. [Nagase H., Fields C.G., Fields G.B. Design and characterization of a fluorogenic substrate selectively hydrolyzed by stromelysin 1 (matrix metalloproteinase-3) - J. Biol. Chem. - 1994. - Vol. 269. - P.209520-20957].

Недоліками відомого способу є використання комерційного субстрату MCA-Pro-Leu-Gly-Leu-DPA-Ala-Arg-NH<sub>2</sub>, що призводить до подорожчання методу (1г коштує 364,0 євро).

Відомий спосіб визначення активності ММП-2 за методом зимографії, який полягає в тому, що проби сироватки розводять у суміші, яка містить тріс-HCL, 2,0%-й розчин додецилсульфату натрію та 10,0%-й гліцерин [Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. - 1970. - Nature. - Vol. 227. - P.680-683]. Гель для проведення електрофорезу (10,0%-й акріламід) полімерізують сумісно з розчином желатини (1мг/мл). Потім проби вносять в трек та проводять електрофоретичний розподіл при постійному тоці. Потім, після закінчення електрофорезу, гель фарбують розчином Coomassie Brilliant Blue. Присутність ММП-2 визначають за наявністю непофарбованих смуг у гелі [Oliver G.W., Stettler-Stevenson W.G., Kleiner D.E. Zymography, casein zymography and reverse zymography: activity assays for proteases and their inhibitors. - 1999. - In.: Handbook of proteolytic enzymes. San Diego<sup>A</sup> Acad. Press. - P.61-70; Min D., Lyons J.G., Jia J., Lo L., McLennan S.V. 2-Methoxy-

U  
(13)  
46633  
(11)  
UA  
(19)

2,4-diphenyl-3(2H)-furanone-labeled gelatin zymography and reverse zymography: a rapid real-time method for quantification of matrix metalloproteinases-2 and -9 and tissue inhibitors of metalloproteinases. - Electrophoresis. - 2006. - Vol. 27, №2. - P.357-364]. Для проведення кількісного аналізу вмісту ММП-2, гелі висушують, сканують, а отриманні зображення оброблюють за допомогою програми QuantiScan.

Недоліками відомого способу є використання додаткового дорогоцінного обладнання та тривалість операцій (до 2-х діб), що збільшує трудомісткість процесу.

Відомий спосіб визначення активності ММП-2, коли в якості субстрату використовують 14С-ацетильований колаген капсули кришталіка ока великої рогатої худоби. Про-ММП-2 активують в присутності амінофенілмеркуріацетату, а потім реакцію гідролізу 14С-ацетильованного колагену проводять при 37 °С на протязі 16 годин. Активність ферменту висловлюють у мкг колагену, що був гідролізований на протязі 16 годин. [Liotta L.A., Tryggvason K., Garbisa S., Robey P.G., Abe S. Partial purification and characterization of a neutral protease which cleaves type IV collagen. - Biochemistry. - 1981. - Vol. 20, №1. - P.100-108]. Даний спосіб обрано в якості найближчого аналога.

Недоліками відомого способу є додаткове використання комерційного препарату амінофенілмеркуріацетату для активування про-ММП-2, використання комерційного препарату колагену IV типу, що призводить до подорожчання методу (5г амінофенілмеркуріацетату коштує 40,0 євро, 1г колагену IV типу коштує 340,0 євро), тривалість реакції гідролізу колагену IV типу (16 годин), а також додатковий процес ацетилювання колагену, що збільшує трудомісткість процесу.

В основу корисної моделі поставлена задача: створити спосіб визначення активності ММП-2 в тканинах з отриманням технічного ефекту, що полягає в зменшенні трудомісткості процесу та в підвищенні його економічності завдяки використанню економічно доступних вітчизняних матеріалів.

Поставлена задача досягається тим, що ММП-2 екстрагують з тканини, потім активність ММП-2, що міститься у супернатанті тканини, визначають за гідролізом білкового субстрату при 37°С за певний час, а продукти гідролізу визначають колориметричним методом, згідно корисної моделі, супернатант тканини, що містить ММП-2, в об'ємі 0,1-

0,2мл інкубують з 0,4-0,8мл розчину желатини на NaCl на водяній бані на протязі 30-45хв без попередньої активації амінофенілмеркуріацетатом, потім продукти реакції визначають на спектрофотометрі при довжині хвилі 570нм.

Загальними ознаками найближчого аналога та способу, який пропонується, є те, що в обох випадках ММП-2 екстрагують з тканини, потім активність ММП-2, що міститься у супернатанті тканини визначають за гідролізом білкового субстрату при 37°С за певний час, а продукти гідролізу визначають колориметричним методом.

Відмінними ознаками способу, який пропонується, є те, що супернатант тканини, що містить ММП-2, в об'ємі 0,1-0,2мл інкубують з 0,4-0,8мл розчину желатини на NaCl на водяній бані на протязі 30-45хв без попередньої активації амінофенілмеркуріацетатом, потім продукти реакції визначають на спектрофотометрі при довжині хвилі 570нм.

В якості білкового субстрату використовують не колаген IV типу (1г якого коштує 340,0 євро), як у прототипі, а желатину (1 ампула 10% розчину вітчизняного виробництва коштує 2,8 грн), та гідроліз білкового субстрату продовжується не 16 годин, як у прототипі, а 30-45хв.

Запропонований спосіб ілюструється наступним прикладом. Пропонуємий спосіб визначення активності ММП-2 багаторазово випробувався в лабораторії біохімії Одеського національного університету імені І.І. Мечникова з доброю відтворюваністю результатів. Помилка не перевищувала 5,0 %-в при проведенні понад 100 експериментів.

Результати досліджень з найкращою відтворюваністю результатів наведені в таблицях 1 та 2.

Пропонуємий спосіб визначення ММП-2 реалізується наступним чином. Супернатант тканини, що містить ММП-2, в об'ємі 0,1мл інкубують з 0,4мл 0,001%-го розчину желатини на 0,9%-го NaCl на водяній бані на протязі 30хв без попередньої активації амінофенілмеркуріацетатом, потім реакцію закінчують додаванням 0,5мл нінгідрин-ацетатної суміші та кип'яченням на водяній бані на протязі 15хв, а потім до суміші додають 2,0мл 50%-го спирту та визначають активність ММП-2 на спектрофотометрі при довжині хвилі 570нм.

Було встановлено, що інкубація супернатантів тканини ендометрія з амінофенілмеркуріацетатом (кінцева концентрація останнього 1,0мМ на пробу) на протязі 45хв не збільшувала активність ММП-2, що свідчить про присутність ММП-2 в тканині ендометрія в активній формі (табл. 1).

Таблиця 1

Вплив амінофенілмеркуріацетату на активність ММП-2 немалігнізованої та пухлинних тканин яєчника (М±m, n=9, мМ гліцину/ мг білка)					
Яєчник					
Немалігнізована тканина		Доброякісна пухлина		Злоякісна пухлина	
Без АФМА	Активність у присутності АФМА	Без АФМА	Активність у присутності АФМА	Без АФМА	Активність у присутності АФМА
1571,1±142,1	1673,1±158,3	4600,5±451,5	4720,5±467,5	9993,3±846,1	10253,3±926,7

Примітка: Активність ММП-2 наведена у мМ гліцину/ мг білка за 1хв інкубації при 37°С; АФМА – аміно-

## фенілмеркуріацетат

Отримані результати свідчать про те, що використання амінофенілмеркуріацетатом для активації ММП-2 недоцільне і може бути виключено, що значно здешевлює метод та скорочує термін визначення активності ММП-2.

В таблиці 2 наведені дані щодо впливу концентрації желатини та тривалості інкубування на активність ММП-2.

Таблиця 2

Вплив концентрації субстрату та тривалості інкубації на активність ММП-2 тканини яєчника ( $M \pm m$ ,  $n=100$ , мМ гліцину/ мг білка)

Співвідношення желатина/NaCl	Тривалість інкубації (хв)	Активність ММП-2
1:200	15	967,0 $\pm$ 93,0
	30	1194,0 $\pm$ 109,0
	60	1321,0 $\pm$ 127,0
1:100	15	1458,0 $\pm$ 132,0
	30	1671,1 $\pm$ 158,1
	60	1565,1 $\pm$ 146,6
1:10	15	1595,1 $\pm$ 152,6
	30	1571,1 $\pm$ 142,1
	60	1568,1 $\pm$ 152,6

Примітка: Активність ММП-2 наведена у мМ гліцину/ мг білка за 1хв інкубації при 37°C.

З даних, наведених у таблиці 2 свідчить, що оптимальним є розчин желатини у NaCl у співвідношенні 1:100 комерційного розчину 10,0%-го желатини (вартість 10 ампул однієї упаковки вітчизняного виробництва становить 28 грн.) тому, що при цій концентрації досягається максимальна активність ферменту (1671,1 $\pm$ 158,1). Збільшення розведення желатини є недоцільним тому, що призводить до втрати понад 15-40%-в активності ферменту, залежно від тривалості інкубації. Незважаючи на високі показники активності ферменту зменшення розведення желатини є недоцільним тому, що призводить до неекономічного розходу субстрату при незначному підвищенні активності ферменту.

Інкубування є оптимальним на протязі 30хв при 37°C, тому що за цей час досягається максимальна активність ММП-2. Зменшення тривалості процесу інкубування до 15хв є недоцільним тому, що призводить до втрати значної кількості активності ферменту. Збільшення тривалості інкубування до 60хв практично не впливає на активність ММП-2, але є недоцільним тому, що збільшує тривалість процесу.

Означений спосіб визначення активності є високочутливий та зручний для поточного вимірювання активності ММП-2 у великій кількості проб.

Експериментальні дослідження запропонованого способу підтвердили, що поставлена задача успішно вирішується завдяки оптимальним умовам процесу визначення активності ММП-2: оптимальній концентрації желатини та тривалості інкубації субстрат-ферментного комплексу.

Таким чином, запропонований спосіб у порівнянні з найближчим аналогом забезпечує зменшення трудомісткості процесу визначення активності ММП-2 з 16 годин до 30хв, дозволяє виключити додаткові затрати на активування про-ММП-2 амінофенілмеркуріацетатом та підвищити його економічність завдяки використанню економічно доступних вітчизняних матеріалів.

Це досягається завдяки тому, що в якості субстрату для визначення активності ММП-2 використовують білковий субстрат желатину, а не колаген IV типу.

Спосіб, що пропонується, надається промисловим підприємствам для використання при виробництві тест-наборів для визначення активності ММП-2 у біологічних рідинах.