



УКРАЇНА

(19) UA (11) 52500 (13) U
(51) МПК (2009)
G01N 33/487
G01N 33/49

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ РІВНЯ ЗАГАЛЬНИХ ГЛІКОПРОТЕЇНІВ У СИРОВАТЦІ КРОВІ

1

(21) u201003004

(22) 16.03.2010

(24) 25.08.2010

(46) 25.08.2010, Бюл.№ 16, 2010 р.

(72) КОЗАР ВАЛЕНТИНА ВІКТОРІВНА, КУДРЯ
МАРІЯ ЯКІВНА, УСТЕНКО НОННА ВАСИЛІВНА,
ІВАННИКОВА СВІТЛАНА ВАЛЕНТИНІВНА

(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ПРО-
БЛЕМ ЕНДОКРИННОЇ ПАТОЛОГІЇ ІМ. В.Я. ДАНИ-

2

ЛЕВСЬКОГО АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇ-
НИ" (ДУ ІПЕП)

(57) Спосіб визначення рівня загальних глікопротеїнів у сироватці крові за допомогою методу Штейнберга-Доценко, який відрізняється тим, що після приготування гемолізат центрифугують, оптичну густину аналітів вимірюють при довжині хвилі 690 нм, а розрахунок проводять за концентрацією глюкози в ммоль/л.

Корисна модель відноситься до медицини і ветеринарії, а саме до визначення рівня глікопротеїнів у клінічному матеріалі, і може бути використана для оцінки патологічних станів, пов'язаних із запальними чи некробіотичними процесами.

Глікопротеїни є важливим структурним компонентом клітинних мембран, основною речовиною базальних структур сполучної тканини та стінок судин артерій. Глікопротеїни є представниками глобулінової фракції білків, до складу яких входять молекули моносахаридів. Моносахариди, які ковалентно зв'язані з білками, змінюють їх біохімічні та імунологічні властивості, просторову конфігурацію тощо [1]. Найбільш відомими представниками таких білків є різні ферменти (холінестераза, церулоплазмін), гормони (гонадотропін, еритропоетин), групспецифічні субстанції крові, протромбін, фібриноген, γ -глобуліни, інтерферони, трансферін, гаптоглобулін, компоненти комплементу, більшість адгезивних молекул, мембранних рецепторів імуннокомпетентних клітин тощо [2, 3]. Глікопротеїни у відповідь на пошкодження чинниками інфекційної та неінфекційної етіології приймають активну участь в процесах репарації печінки, а також в інактивації ряду біологічних агентів, виконуючи захисні функції [4, 5].

Концентрація глікопротеїнів зростає при запальних та деструктивних процесах, таких як інфаркт міокарда, пневмонія, цукровий діабет, гломеруло-нефрит, злоякісні пухлини, колагенози, холецистит, гострий та хронічний лейкоз тощо. Зниження

рівня глікопротеїнів спостерігається при розсіяному склерозі, порушеннях білоксинтетичної функції печінки - гепатоцелюлярній дистрофії, хронічному гепатиті, цирозі печінки та ін. [6, 7].

Таким чином, визначення концентрації глікопротеїнів в сироватці крові дає змогу судити як про інтенсивність запального процесу та перебіг захворювання, так і про ефективність проведеного лікування.

Серед способів, які на сьогодні використовуються в клінічній лабораторній діагностиці, найбільш поширено визначення вуглеводно-білкових комплексів по одному з компонентів, що входять до їх складу (гексозам, гексозамінам, фукозі, сіаловим кислотам). Тобто, вказані методи націлені на визначення окремого представника фракції глікопротеїнів, а не їх загальної кількості. Такий підхід використовують з метою диференційної діагностики, наприклад, при захворюваннях опорно-рухової системи [8]. Для визначення вказаних аналітів використовують спектрофотометричний метод, а для приготування калібрувальних розчинів застосовують галактозу та манозу, за якими ведуть розрахунок кількості тієї чи іншої фракції глікопротеїнів. [9]

Найбільш близьким до запропонованого є метод Штейнберга-Доценко, в якому для визначення рівня глікопротеїнів використовується 20% розчин трихлороцтової кислоти (ТХО), 10% розчин молібденовокислого амонію, сірчана кислота, оцінка проводиться за концентрацією глюкози [10]. Опти-

(13) U

(11) 52500

(19) UA

чна густина розчинів вимірюється на фотоколориметрі з використанням червоного світлофільтра.

До недоліків цього способу можна віднести необхідність фільтрації гідролізату та недостатню чутливість, яка спричинена вимірюванням оптичної густини при довжині хвилі, що не відповідає максимальному поглинанню розчину. Розрахунок проводиться за концентрацією глюкози у відсотках, що не відповідає стандартним одиницям вимірювань рівня глюкози.

Задача корисної моделі - розробка оптимізованого способу визначення рівня загальних глікопротеїнів у сироватці крові.

Поставлена задача вирішується тим, що для визначення рівня загальних глікопротеїнів в сироватці крові після приготування гемолізат центрифугують, оптичну густину аналітів вимірюють при довжині хвилі 690нм, а розрахунок проводять за концентрацією глюкози в ммоль/л.

Технічний результат - спрощення технології та підвищення чутливості методу визначення рівня загальних глікопротеїнів.

У розробленому способі замість фільтрації гемолізату застосовують центрифугування, що зменшує час проведення реакції та мінімізує контакт з досліджуваною сироваткою та хімічними реагентами, оптичну густину розчинів вимірюють при довжині хвилі, при якій, згідно знятого спектру розчину, спостерігали максимальне поглинання; після визначення оптичної густини проб концентрацію аналіту розраховують по стандартним розчинам, використовуючи коефіцієнт регресії.

Запропонований спосіб здійснюється таким чином. До 2мл води дистильованої додають 0,1мл досліджуваної сироватки, перемішують ретельно, потім додають 0,5мл ТХО, знову ретельно перемішують, ставлять на киплячу водяну баню на 20 хвилин. Охолоджують під проточною водою протягом 10 хвилин, потім центрифугують 15 хвилин при 3000об/хв. Після цього відбирають у чисту пробірку 1мл центрифугату (гідролізату), додають до нього 3,5мл молібденовокислого реактиву (3мл сірчаної кислоти, х. ч, 87мл води дистильованої, 15мл 10% розчину молібденовокислого амонію на дистильованій воді). Пробу знову ставлять на водяну баню на 20 хвилин. Охолоджують. Вимірюють оптичну густину розчину при довжині хвилі 690нм.

Паралельно вимірюють за тих же умов оптичну густину градувального розчину, утвореного додаванням молібденовокислого реактиву до розчинів глюкози в концентрації від 0 до 111ммоль/л. Розраховують параметри рівняння регресії:

$$Y=A+B \cdot X,$$

де Y - оптична густина градувальних розчинів,

X - концентрація градувальних розчинів, ммоль/л,

A - вільний член,

B - коефіцієнт регресії.

Рівень загальних глікопротеїнів у пробі, що досліджують, розраховують за рівнянням:

$$X_1=(Y_1-A)/B$$

де X₁ - концентрація досліджуваного розчину, ммоль/л

Y₁ - оптична густина досліджуваної проби,

B - коефіцієнт регресії, розрахований за результатами градувальних розчинів,

A - вільний член, розрахований за результатами градувальних розчинів.

Суть корисної моделі ілюструється прикладом її конкретного застосування. Рівень загальних глікопротеїнів визначали у сироватці крові інтактних щурів. Значення показників знаходилися у межах від 0,440 до 0,547 од. оптичної густини, що відповідало концентрації глюкози 89,8±3,8ммоль/л. За методом Штейнберга-Доценко значення показників оптичної густини знаходилися в межах від 0,412 до 0,588, середній рівень загальних глікопротеїнів відповідав 92,7±3,2ммоль/л. Вірогідна різниця між показниками відсутня.

Нормальними показниками рівня загальних глікопротеїнів у людини вважають 55,5-83,3ммоль/л, що відповідає 0,300-0,400 од. оптичної густини.

Використання запропонованого способу для кількісної оцінки рівня загальних глікопротеїнів у сироватці крові є адекватним біохімічним тестом.

Джерела інформації:

1. Уайт А., Лендлер Ф., Смит Э, Р. Хилл, И. Леман. Основы биохимии. - М.: Мир, 1981. - Т.1-3. - 1879с.

2. Luo S.-Z., Mo X., Lopez J. A., Li R. Role of the transmembrane domain of glycoprotein IX in assembly of the glycoprotein Ib-IX complex // J. Thromb. Haemost. - 2007. - Vol.5, N.12. - P.2494-2502.

3. Dvorin E. L., Jacobson J., Roth S. J., Bischoff J. Human Pulmonary Valve Endothelial Cells Express Functional Adhesion Molecules for Leukocytes // Heart. Valve. Dis. - 2003. - Vol.12, N.5. - P.617-624.

4. Hosokawa N., Kamiya Y., Kamiya D., Kato K., Nagata K. Human OS-9, a lectin required for glycoprotein endoplasmic reticulum-associated degradation, recognizes mannose-trimmed N-glycans // J. Biol. Chem. - 2009. - Vol.284. - N.25. - P.17061-17068.

5. Banerjee S., Vishwanath P., Cui J., Kelleher D. J., Gilmore R., Robbins P. W., Samuelson J. The evolution of N-glycan-dependent endoplasmic reticulum quality control factors for glycoprotein folding and degradation // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. - 2007. - Vol.104. - N.28. - P.11676-11681.

6. Yuan K., Kucik D., Singh R. K., Listinsky C. M., Listinsky J. J., Siegal G. P. Alterations in human breast cancer adhesion-motility in response to changes in cell surface glycoproteins displaying alpha-L-fucose moieties // Int. J. Oncol. - 2008. - Vol.32. - N.4. - P.797-807.

7. Volcik K.A., Ballantyne C.M., Coresh J., Folsom A.R., Boerwinkle E. Specific P-Selectin and P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 Genotypes/Haplotypes are Associated with Risk of Incident CHD and Ischemic Stroke: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study // Atherosclerosis. - 2007. - Vol. 195. - N.1. - P.e76-e82.

8. Лабораторные методы исследования в клинике. Справочник / Под ред. В. В. Меньшикова. - М.: Медицина, 1987. - 368с.

9. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностики - М.: "МЕДпресс-информ", 2004. - 920с.

10. Штейнберг С.Я., Доценко Я.Н. Новый метод определения гликопротеидов в сыворотке и плазме крови // Врачебное дело. - 1962. - №12. - С.43-45.