



УКРАЇНА

(19) UA (11) 56689 (13) U
(51) МПК (2011.01)
A61B 10/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ІНГІБІТОРУ ТРИПСИНОПОДІБНИХ ПРОТЕЇНАЗ

1

(21) u201007856

(22) 23.06.2010

(24) 25.01.2011

(46) 25.01.2011, Бюл.№ 2, 2011 р.

(72) ДІВОЧА ВАЛЕНТИНА ПАНАСІВНА, МИХАЛЬ-
ЧУК ВАСИЛЬ МИКОЛАЙОВИЧ(73) ДІВОЧА ВАЛЕНТИНА ПАНАСІВНА, МИХАЛЬ-
ЧУК ВАСИЛЬ МИКОЛАЙОВИЧ

(57) Спосіб визначення активності інгібітору трипсиноподібних протеїназ шляхом дослідження сироватки крові людини з використанням казеїну, розчиненого буфером, та трихлороцтової кислоти, який **відрізняється** тим, що після підготовки матеріалу та реактивів для визначення активності інгібітору трипсиноподібних протеїназ сироватку крові розчиняють фізіологічним розчином до 1:10, а казеїн розчиняють 0,2 М фосфатним буфером, трипсин розчиняють 0,2 М ацетатним буфером та 2,0 М хлористим кальцієм, після чого додають 2-3 мл реактиву А і 0,2-0,3 мл реактиву Фоліна, після чого через 20-30 хвилин зупиняють реакцію, використовуючи трихлороцтову кислоту, та колоримет-

2

тують розчин при довжині хвилі 750 нм, причому активність інгібітору трипсиноподібних протеїназ розраховують за формулою:

$$TIA = \frac{(\Delta E_{TP} - \Delta E_I) \times p \times 10^{-3} \times 0,1}{\Delta E_{TP}}, \text{ де:}$$

TIA - активність інгібітору трипсиноподібних протеїназ;

ΔE_{TP} - екстинція трипсину (ферменти - протеїнази);

ΔE_I - екстинція інгібітору;

p - розведення (1:10) сироватки;

10^{-3} - множник для переведу г у кг;

0,1 - концентрація трипсину 0,1 мг/мл,

і за різницею між активністю проби, яка містить визначену за наведеною формулою кількість трипсину, і активністю контрольної проби, в якій протеїназа зупинена ТХО, визначають активність ферментів, зв'язаних з інгібіторами трипсиноподібних протеїназ.

Корисна модель стосується медицини, а саме біохімії ферментів людини, і може бути використана для визначення активності інгібітора трипсиноподібних протеїназ.

Проблема взаємозв'язку вірусів з ферментами людини відноситься до числа найбільших науково-практичних проблем, які дотепер мало вивчені (досліджені) і набувають з кожним разом все більш гострий характер.

Виключна роль у діагностиці вірусних інфекцій належить визначенню активності протеолітичних ферментів та їх інгібіторів. Інгібітори протеолітичних ферментів є білковими речовинами, які гальмують каталітичну дію ферментів, розщеплюють білки (протеїнази). Властивості інгібіторів протеїназ повністю не вивчені.

Рішення цієї проблеми в значній мірі залежить від знання кількісного вмісту інгібітора трипсиноподібних протеїназ у крові людини.

Існує ряд методів визначення загальної антитриптичної активності сироватки крові. Самим по-

ширеним є, так званий казеїновий метод, за яким вміст інгібітора оцінюється шляхом гальмування гідролізу казеїну кристалічним трипсином (1).

Найбільш близьким до заявленого є метод, який заснований на визначенні різниці між активністю проби, яка містить визначену кількість трипсину, та активністю проби, в якій частина ферменту зв'язана інгібіторами сироватки (2).

Активність інгібітора у зазначеному методі Веремєєнко К.Н. визначають наступним чином: до 2 мл розчиненої у 100 разів сироватки крові додають 0,2 мл ферменту (12,5 мкг). Для утворення комплексу фермент-інгібітор реакційну суміш витримують при температурі +20 °С протягом 20 хв, потім доводять об'єм проби до 1 мл мединаловим буфером. До суміші додають 1 мл розчину казеїну, інкубують 20 хв при температурі +35 °С. Реакцію зупиняють шляхом додавання 3 мл 5% розчину трихлороцтової кислоти. Контрольні проби відрізняються від дослідних тим, що кислоту вносять до додавання казеїну, що дозволяє зупинити реакцію.

(13) U

(11) 56689

(19) UA

У прозорому фільтраті, одержаному при центрифугуванні на протязі 30 хв при 3000 g, визначають оптичну щільність продуктів розпаду казеїну, фотометруючи у спектрофотометрі дослідну пробу в порівнянні з контрольною - при довжині хвилі 280 нм. Кількість залишеного після зв'язування з інгібіторами ферменту розраховують за допомогою калібрувальної кривої, яка складена за кристалічним трипсином і за різницею між кількістю доданого та залишеного після інкубації з сироваткою крові ферменту визначають кількість трипсину, зв'язаного з інгібіторами.

Однак, вказаний метод має суттєві недоліки: невелика недостатня чутливість методу до кількісного визначення активності інгібітора трипсиноподібних протеїназ, необхідність мати ряд дефіцитних реактивів та складного обладнання.

В основу корисної моделі поставлено задачу вдосконалення способу визначення активності інгібітора трипсиноподібних протеїназ шляхом додавання досліджуваного розчину реактивів А та Фоліна для визначення кількості білка, що дозволить підвищити чутливість методу, здешевити його та прискорити термін визначення активності інгібітора трипсиноподібних протеїназ, що конче важливо при діагностиці запальних процесів та інфекційних хвороб.

Поставлена задача вирішується тим, що, згідно корисної моделі, після підготовки матеріалу та реактивів для визначення активності інгібітора трипсиноподібних протеїназ, сироватку крові розчиняють фізіологічним розчином до 1:10, а казеїн розчиняють 0,2 М фосфатним буфером, трипсин розчиняють 0,2 М ацетатним буфером та 2,0 М хлористим кальцієм, після чого додають 2-3 мл реактиву А і 0,2-0,3 мл реактиву Фоліна, після чого через 20-30 хвилин зупиняють реакцію, використовуючи трихлороцтову кислоту та колориметрують розчин при довжині хвилі 750 нм.

Спосіб виконується наступним чином. У пробірці змішують рівні об'єми (0,3-0,5 мл) розчину трипсину та дослідженого розчину інгібітору. Витримують 10 хв при кімнатній температурі, відбирають 0,2 мл суміші та переносять до центрифужної пробірки. До цієї пробірки додають 0,4 мл розчину казеїну, перемішують на протязі 15 с та поміщають до водяного ультратермостату при +30°C на 30 хв.

Зупиняють реакцію, додаючи 0,6 мл 10 % трихлороцтової кислоти, обережно перемішують та центрифугують при 3000 g протягом 15 хв. Відбирають 0,2 мл надосадкової рідини, додають 2 мл реактиву А і 0,2 реактиву Фоліна, розведеного водою у 2 рази. Через 30 хвилин вимірюють екстинцію на фотоелектроколориметрі чи спектрофотоколориметрі при довжині хвилі 750 нм проти контролю на реактиви (0,2 мл 5 % ТХО + 2 мл реактиву Фоліна у розведенні 1:2).

Одночасно ставлять пробу на активність трипсину. Для цього в пробірці змішують рівні об'єми трипсину та розчинника, на якому приготовлено розчин інгібітора. Витримують 10 хв при кімнатній температурі, відбирають 0,2 мл суміші і далі чинять так, як наведено вище: до суміші трипсина з інгібітором.

Крім того, ставлять два контролю на нульовий час. У контролі K_1 до 0,2 мл трипсина з інгібітором додають 0,6 мл 10 % ТХО і потім 0,4 мл розчину казеїну. Центрифугують, відбирають 0,2 мл надосадкової рідини та проводять реакцію з реактивом Фоліна. У контролі K_2 до 0,2 мл трипсина з розчинником для інгібітора додають 0,6 мл 10 % ТХО, потім 0,4 мл розчину казеїну і далі обробляють як K_1 . Вимірюють екстинцію при 750 нм на КФК-3 чи на СФ-46.

Вміст інгібітора розраховують за формулою:

$$TIA = \frac{(\Delta E_{TP} - \Delta E_I) \times p \times 10^{-3} \times 0,1}{\Delta E_{TP}}, \text{ де:}$$

TIA - трипсинінгібуюча активність;

ΔE_{TP} - екстинція трипсина (ферменти - протеїнази);

ΔE_I - екстинція інгібітора;

p - розведення (1:10) сироватки;

$10^{-3} = 1/1000$ - множник для переведу г у кг;

0,1 - концентрація трипсину 0,1 мг/мл,

і за різницею між активністю проби, яка містить визначену за наведеною формулою кількість трипсину і активністю контрольної проби, в якій протеїназа зупинена ТХО, визначають активність ферментів, зв'язаних з інгібіторами трипсиноподібних протеїназ.

У таблиці надані порівняльні ознаки методів прототипу і запропонованого способу.

Таблиця

Порівняльні ознаки методів визначення активності інгібіторів протеїназ прототипу (1) і запропонованого способу (2)

1	2
1. мединаловий буфер	1. 0,2 М фосфатний буфер (К, Na)
2. ТХО 5,0%	2. ТХО 10,0%
3. об'єм додаваного розчину казеїну - 1,0 мл	3. об'єм додаваного розчину казеїну - 0,6 мл
4. центрифугування при 3000 g	4. центрифугування при 6000-7000 g
5. спектрофотометрування при 280 нм	5. колориметрування при 750 нм
6. різні схеми перерахунку	6. різні схеми перерахунку
	7. менші затрати реактивів та вища чутливість методу

В порівнянні з прототипом запропоноване технічне рішення дозволяє підвищити чутливість спо-

соду за рахунок додавання до досліджуваного розчину реактиву Фоліна з метою визначення кілько-

сті білка, здешевити дослідження, використовуючи доступні реактиви та обладнання, прискорити термін визначення активності інгібітора трипсиноподібних протеїназ, що має особливе значення для діагностики запальних процесів та інфекційних хвороб.

Може бути застосований в фармацевтичній промисловості для одержання інгібітора трипсиноподібних протеїназ як противірусного засобу, а також в установах переливання крові для диференціювання її запропонованим способом (визна-

чення кількості інгібітора трипсиноподібних протеїназ: чим більший вміст інгібітора протеїназ, тим більш придатна кров для трансфузії її хворим з гострими запальними процесами.

Література:

1. Нортроп Д., Кунитц М., Херрпотт Р. Кристаллические ферменты. - М.: 1950. - 346 с.

2. Веремеенко К.Н., Голобородько О.П., Кизим А.И. Методы определения сывороточных ингибиторов протеолиза. Протеолиз в норме и при патологии. - Киев: Здоровья, 1988. - С. 173-174.