



УКРАЇНА

(19) UA (11) 18884 (13) U  
(51) МПК (2006)  
A61B 10/00  
G01N 33/48

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

**(54) СПОСІБ ОЦІНКИ РІВНЯ ЕНЕРГЕТИЧНОГО МЕТАБОЛІЗМУ МІОКАРДА ШЛЯХОМ ДОСЛІДЖЕННЯ БІОХІМІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ТКАНИНИ МІОКАРДА IN VIVO**

1

(21) u200606656

(22) 15.06.2006

(24) 15.11.2006

(46) 15.11.2006, Бюл. № 11, 2006 р.

(72) Твердохліб Ігор Володимирович, Шпонька Ігор Станіславович, Козлов Володимир Олексійович, Машталір Марина Анатолійовна, Мішалов Володимир Дем'янович, Козлов Сергій Володимирович, Дунаєв Олександр Віталійович

(73) Твердохліб Ігор Володимирович, Шпонька Ігор Станіславович, Козлов Володимир Олексійович, Машталір Марина Анатолійовна, Мішалов Володимир Дем'янович, Козлов Сергій Володимирович, Дунаєв Олександр Віталійович

(57) Спосіб оцінки рівня енергетичного метаболізму міокарда шляхом дослідження біохімічних властивостей тканини міокарда in vivo, що включає

2

спектрофотометричну реєстрацію утворення відновленої форми нікотинаміддинуклеотиду в інкубаційному середовищі, який **відрізняється** тим, що після гомогенізації взірця проводять паралельне визначення активності цитоплазматичної і мітохондріальної фракцій лактатдегідрогенази (КФ 1.1.1.27), піруватдегідрогенази (КФ 1.2.4.1), НАД-залежної малатдегідрогенази (КФ 1.1.1.37), аланінамінотрансферази (КФ 2.6.1.2), аспартатамінотрансферази (КФ 2.6.1.1), глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (КФ 1.1.1.49), 6-фосфоглюконатдегідрогенази (КФ 1.1.1.44), сукцинатдегідрогенази (КФ 1.3.99.1), концентрації загального білка цитоплазми і мітохондрій, пірувату і малату і за величиною показників активності ферментів оцінюють рівень метаболізму міокарда.

Корисна модель відноситься до медицини, зокрема до діагностики, наприклад до визначення вимірювань чи реєстрації, дослідження чи аналізу матеріалів шляхом визначення їх біохімічних властивостей та може бути використаною в кардіології.

Відомий спосіб дослідження метаболізму міокарда [1], оснований на інфузії серця тварин субстратом з наступним вимірюванням його концентрації в артеріальній і венозній крові. Недолік технічного рішення цього способу зумовлений трудомісткістю і тривалістю терміну проведення, а також обмеженою інформативністю і точністю, зумовлених тим, що в ході одного експерименту досліджується тільки один із численних біохімічних показників метаболізму міокарда.

Відомий спосіб визначення складу креатиніна, креатина і саркозіна в біологічних рідинах [2], що включає інкубацію проби з реагентом, який містить буферні речовини і інші інгредієнти, з наступним вимірюванням інтенсивності фарбування отриманої суміші з стандартним взірцем при довжині хвилі 546нм.

Недоліком об'єкта також є низька точність кінцевого результату, що зумовлене неможливістю

вивчення біологічних тканин і органів, а також значними витратами біологічних рідин (3-5мл).

В основі способу визначення активності дегідрогеназ пентозофосфатного шляху [3] покладене фракціонування гомогената досліджуваного взірця (шматочка тканини масою 1-5г) методом диференціального центрифугування у соляному буфері, який містить 0,15M KCL і 0,02M KHCO<sub>3</sub> і отриманні цитоплазматичної і мітохондріальної фракцій. Визначення ферментативної активності глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (КФ 1.1.1.49) і 6-фосфоглюконатдегідрогенази (КФ 1.1.1.44) в отриманих фракціях проводять в інкубаційному середовищі (обсягом 3,0мл), що містить 5мкМ трис HCL буфер, 50 МКМgCL<sub>2</sub>, 5мкМ субстрата (глюкозо-6-фосфат (натрієва сіль) або 6-фосфоглюконат (натрієва сіль)). В кювету спектрофотометра додають 3мл інкубаційного середовища, 0,1мл гомогената і починають реакцію шляхом додавання 0,1мл 5мкМ розчину НАДФ. Вивчення оптичної щільності розчину в ході дегідрогеноїзованої реакції реєструють шляхом спектрофотометрії протягом 5хв з інтервалом 1хв. Розрахунок активності ферментів проводять за формулою:

(13) U

(11) 18884

(19) UA

$A=3000\Delta E/6,22 a$ ,

де  $a$  – вміст білка в досліджуваній пробі, мг;  $\Delta E$  – зміна оптичної щільності розчину в середньому за 1хв. Вміст білка визначають за методом Bradford [4]. Для цього 0,1мл мітохондріальної або плазматичної фракцій взірця вносять в 5мл 0,01% розчину Кумасі G-250, який містить 4,7% етанолу і 8,5% ортофосфорної кислоти. Через 2хв вимірюють оптичну щільність розчину за допомогою спектрофотометра при довжині хвилі 595нм. Вміст білка визначають по калібровочній кривій, отриманій при використанні відомих концентрацій альбуміну.

Як і вищезазначене сімейство аналогів, цей спосіб теж характеризується замалою точністю, внаслідок неможливості одночасного визначення активності ферменту і відповідного субстрату в одному взірці (ділянці тканини), значними витратами біологічного матеріалу, що не дозволяє проводити визначення ферментативної активності в обсязі тканини масою менше 1г, а також замалою інформативністю дослідження, зумовленою неможливістю паралельного визначення і співставлення активності деяких ферментів із різних циклів енергетичного метаболізму.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити такий спосіб оцінки рівня енергетичного метаболізму міокарда шляхом дослідження біохімічних властивостей тканини міокарда *in vivo*, який шляхом спектрофотометричної реєстрації утворення відновленої форми нікотинаміддинуклеотида в інкубаційному середовищі, в якому за рахунок паралельного визначення активності цитоплазматичної і мітохондріальної фракцій різних ферментів енергетичного метаболізму забезпечується можливість проведення кількісного співставлення інтенсивності різних метаболічних циклів в одному взірці міокарда, у тому числі на обмеженій кількості тканини (біопсійний матеріал при діагностичних операціях в клініці; малі лабораторні тварини, ембріональне серце), забезпечує підвищення точності та зниження тривалості дослідження при використанні.

Вищезазначений технічний результат, досягається тим, що у відомому способі оцінки рівня енергетичного метаболізму міокарда шляхом дослідження біохімічних властивостей тканини міокарда *in vivo*, що включає спектрофотометричну реєстрацію утворення відновленої форми нікотинаміддинуклеотида в інкубаційному середовищі, у відповідності з корисною моделлю, додатково після гомогенізації взірця проводять паралельне визначення активності цитоплазматичної і мітохондріальної фракцій лактатдегідрогенази (КФ 1.1.1.27), піруватдегідрогенази (КФ 1.2.4.1), НАД-залежної малатдегідрогенази (КФ 1.1.1.37), аланінамінотрансферази (КФ 2.6.1.2), аспартатамінотрансферази (КФ 2.6.1.1), глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (КФ 1.1.1.49), 6-фосфоглюконатдегідрогенази (КФ 1.1.1.44), сукцинатдегідрогенази (КФ 1.3.99.1), концентрації загального білка цитоплазми і мітохондрій, пірувату і малату, і за величиною показників активності ферментів оцінюють рівень метаболізму міокарда.

За умов відтворення способу, саме паралельне визначення активності цитоплазматичної і мітохондріальної фракцій лактатдегідрогенази (КФ

1.1.1.27), піруватдегідрогенази (КФ 1.2.4.1), НАД-залежної малатдегідрогенази (КФ 1.1.1.37), аланінамінотрансферази (КФ 2.6.1.2), аспартатамінотрансферази (КФ 2.6.1.1), глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (КФ 1.1.1.49), 6-фосфоглюконатдегідрогенази (КФ 1.1.1.44), сукцинатдегідрогенази (КФ 1.3.99.1), концентрації загального білка цитоплазми і мітохондрій, пірувату і малату, компенсують наслідки низької точності, зумовленої неможливістю одночасного визначення активності ферменту і відповідного субстрату в одному взірці (ділянці тканини), значними витратами біологічного матеріалу, що не дозволяє проводити визначення ферментативної активності в обсязі тканини масою менше 1г, а також замалою інформативністю дослідження, зумовленої неможливістю паралельного визначення і співставлення активності деяких ферментів із різних циклів енергетичного метаболізму, а від того, забезпечують покращення точності оцінки рівня енергетичного метаболізму міокарда шляхом дослідження біохімічних властивостей тканини міокарда *in vivo*. Порівняння заявленого технічного рішення з прототипом дозволило встановити його відповідність критерію «новизна», а сукупність відокремлюючих ознак корисної моделі є суттєвою, бо має причинно-наслідковий зв'язок з вирішенням поставленої задачі. Об'єкт групи відповідає умові «винахідницький рівень», оскільки явним чином не впливає з рівня техніки, що встановлений заявником.

Відомості, які підтверджують можливість відтворення способу оцінки рівня енергетичного метаболізму міокарда шляхом дослідження біохімічних властивостей тканини міокарда *in vivo*, з досягненням вищезазначеного технічного результату полягають у наступному.

Із 150мг тканини міокарда біопсійного матеріалу отримують 5% тканинний гомогенат. Із 3мл приготованого на холоді гомогенату відбирають 1,6мл для визначення концентрації лактату, малату, пірувату, а решту частини 1,4мл підпорядковують диференціальному центрифугуванню для визначення активності цитоплазматичної і мітохондріальних фракцій лактатдегідрогенази (КФ 1.1.1.27), піруватдегідрогенази (КФ 1.2.4.1), НАД-залежної малатдегідрогенази (КФ 1.1.1.37), аланінамінотрансферази (КФ 2.6.1.2), аспартатамінотрансферази (КФ 2.6.1.1), глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (КФ 1.1.1.49), 6-фосфоглюконатдегідрогенази (КФ 1.1.1.44), сукцинатдегідрогенази (КФ 1.3.99.1), концентрації загального білка цитоплазми і мітохондрій за методом Bradford [4].

Пропонований спосіб оцінки рівня енергетичного метаболізму міокарда шляхом дослідження біохімічних властивостей тканини міокарда *in vivo* забезпечує підвищення точності діагностики на 20% та скорочує тривалість останньої у 1,5 рази у порівнянні з прототипом, переважно за рахунок паралельного визначення активності цитоплазматичної і мітохондріальної фракцій лактатдегідрогенази (КФ 1.1.1.27), піруватдегідрогенази (КФ 1.2.4.1), НАД-залежної малатдегідрогенази (КФ 1.1.1.37), аланінамінотрансферази (КФ 2.6.1.2), аспартатамінотрансферази (КФ 2.6.1.1), глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (КФ 1.1.1.49), 6-

фосфоглюконатдегідрогенази (КФ 1.1.1.44), сукцинатдегідрогенази (КФ 1.3.99.1), концентрації загального білка цитоплазми і мітохондрій, пірувату і малату.

Приклад. Під час проведення хірургічного втручання з приводу атеросклеротичної серцево-судинної хвороби серця у хворого чоловіка 43 років були вилучені два шматочки біопсійного матеріалу із лівого шлуночка: один із зони ішемії, другий - із патологічно не зміненої зони. Із 150мг тканини міокарда біопсійного матеріалу відповідно кожного взірця отримали 5% тканинний гомогенат. Із 3мл приготованого на холоді гомогенату відбирали 1,6мл для визначення концентрації лактату, манату, пірувату, а решту частини 1,4мл підпорядковували диференціальному центрифугуванню

для визначення активності цитоплазматичної і мітохондріальних фракцій лактатдегідрогенази (КФ 1.1.1.27), піруватдегідрогенази (КФ 1.2.4.1), НАД-залежної малатдегідрогенази (КФ 1.1.1.37), аланінамінотрансферази (КФ 2.6.1.2), аспаратамінотрансферази (КФ 2.6.1.1), глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (КФ 1.1.1.49), 6-фосфоглюконатдегідрогенази (КФ 1.1.1.44), сукцинатдегідрогенази (КФ 1.3.99.1), концентрації загального білка цитоплазми і мітохондрій за методом Bradford [4]. Результати вимірювань змін біохімічних показників визначили відмінність рівня енергетичного метаболізму міокарда в патологічно не зміненій зоні ділянки міокарда лівого шлуночка і в зоні ішемії ділянки міокарда лівого шлуночка хворого, що наведене в таблиці.

Таблиця

Показники концентрації біохімічних ферментів в патологічно не зміненій зоні ділянки міокарда лівого шлуночка і в зоні ішемії ділянки міокарда лівого шлуночка хворого

| № з/п | Біохімічні ферменти та їх активність          | Концентрація ферментів в патологічно не зміненій зоні ділянки міокарда лівого шлуночка | Концентрація ферментів в зоні ішемії ділянки міокарда лівого шлуночка |
|-------|---|--|---|
| 1     | Лактат  | 2,04мкмоль/г   | 0,23мкмоль/г  |
| 2     | Піруват                                       | 0,14мкмоль/г   | 0,01мкмоль/г  |
| 3     | Малат   | 0,36   | 0,02  |
| 4     | Білок в мітохондріальній фракції              | 53,6мг/г   | 23,3мг/г  |
| 5     | Білок в цитоплазматичній фракції              | 18,3мг/г   | 08,1мг/г  |
| 6     | Активність ЛДГ в мітохондріальній фракції     | 0,39мкмоль НАД/хв на 1мг білка   | 0,02мкмоль НАД/хв на 1мг білка  |
| 7     | Активність ЛДГ в цитоплазматичній фракції     | 1,68мкмоль НАД/хв на 1мг білка   | 0,52мкмоль НАД/хв на 1мг білка  |
| 8     | Активність ПДГ в мітохондріальній фракції     | 23,8мкмоль НАД/хв на 1мг білка   | 8,97мкмоль НАД/хв на 1мг білка  |
| 9     | Активність ПДГ в цитоплазматичній фракції     | 12,3мкмоль НАД/хв на 1мг білка   | 3,64мкмоль НАД/хв на 1мг білка  |
| 10    | Активність НАД-МДГ в мітохондріальній фракції | 1,24мкмоль НАД/хв на 1мг білка   | 0,15мкмоль НАД/хв на 1мг білка  |
| 11    | Активність НАД-МДГ в цитоплазматичній фракції | 2,11мкмоль НАД/хв на 1мг білка   | 0,08мкмоль НАД/хв на 1мг білка  |
| 12    | Активність трансамінази АлАТ                  | 0,346мкмоль пірувата/г тканини за год.   | 0,063мкмоль пірувата/г тканини за год.                                |
| 13    | Активність трансамінази АсАТ                  | 0,633 мкмоль пірувата/г тканини за год.  | 0,137 мкмоль пірувата/г тканини за год.                               |
| 14    | Активність Г6ФДГ в мітохондріальній фракції   | 6,14нмоль НАД/хв на 1мг білка  | 1,53нмоль НАД/хв на 1мг білка   |
| 15    | Активність Г6ФДГ в цитоплазматичній фракції   | 2,43нмоль НАД/хв на 1мг білка  | 0,23нмоль НАД/хв на 1мг білка   |
| 16    | Активність 6ФГДГ в мітохондріальній фракції   | 3,87нмоль НАД/хв на 1мг білка  | 0,78нмоль НАД/хв на 1мг білка   |
| 17    | Активність 6ФГДГ в цитоплазматичній фракції   | 1,22нмоль НАД/хв на 1мг білка  | 0,11нмоль НАД/хв на 1мг білка   |
| 18    | Активність СДГ                                | 12,4нмоль сукцината/хв на 1мг білка  | 2,21нмоль сукцината/хв на 1мг білка                                   |

Таким чином, як видно із прикладу конкретного випадку, пропонувані способи дозволяють провести кількісне співставлення інтенсивності різних метаболічних циклів по одному взірцю біопсійного матеріалу (за рахунок паралельного визначення активності ферментів циклу трикарбонових кислот,

окислювального фосфорилування, трансамінування, пентозо-фосфатного шунта), тобто - визначити рівень енергетичного метаболізму в патологічно зміненій зоні ділянки міокарда, що дозволяє підвищити точність дослідження, обмежити обсяг хірургічного втручання.

Джерела інформації

1. А.с. 1347016 СССР. МКИ G01N33/49. Способ исследования метаболизма миокарда/ М.Т. Парашко (СССР). - 5с.

2. А.с. 1582993 СССР. G01N33/68. Способ определения содержания креатинина, креатина и саркозина в биологических жидкостях/Л.М. Чебышев (СССР). - 6с.

3. Путилина Ф.Е., Зоидзе С.Д. Определение

активности дегидрогеназ пентозофосфатного пути //Методы биохимических исследований (Липидный и энергетический обмен). - Учебное пособие /Под ред. М.И. Прохоровой. - Л.: Изд.во Ленингр. ун-та. - 1982. - С.168-172.

4. Bradford M.M. A rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein-Dye Binding// Analytical Biochemistry. - 1976. - N 2. - P.248-254.