

Изобретение относится к медицине и касается клинико-лабораторных методов исследования, а именно клинической биохимии.

В настоящее время все способы определения в сыворотке крови аномалии активации ферментов основаны на изучении их активности при взаимодействии с субстратом (Хорст А. Молекулярные основы патогенеза болезней. - М.: Медицина, 1982).

Известен способ определения аномалии активации фермента, например, аспаратаминотрансферазы (АсАТ) в сыворотке крови, который проводится путем соединения исследуемой сыворотки крови с субстратом и последующим добавлением в биологическую смесь индикаторного реактива, а затем по изменению окраски этого индикатора судят о снижении или повышении активности фермента, характеризующих аномалию его активации (Лабораторные методы исследования в клинике: Справ. / Под ред. В.В. Меньшикова. - М.: Медицина, 1987. - С.181 - 215).

За прототип принят способ определения аномалии активации фермента аланинаминотрансферазы (АлАТ) в сыворотке крови, активность которого определяют путем соединения сыворотки и субстрата для АлАТ в соотношении 1 : 10. Затем в полученную биологическую смесь добавляют индикатор, после чего производят фотометрирование полученной биологической смеси и по изменению ее оптической плотности судят об аномалии активации фермента (Справочник по клинической химии / В.Г. Колб, В.С. Камышников. - Минск: Высш. шк., 1982. - С.387).

Однако известный способ и способ-прототип имеют следующие недостатки:

низкая чувствительность, которая не позволяет определять скрытые аномалии активации ферментов;

недостаточная информативность и диагностическая ценность исследования, которые не позволяют использовать метод на ранних стадиях заболеваний, например, при разных клинических формах ИБС, хронического персистирующего гепатита и пр.;

исследование активности фермента по косвенным признакам - образованию продуктов его катализа, для выявления которых необходим дополнительный индикатор;

многоэтапность исследования и использование многокомпонентных тест-систем.

В основу изобретения поставлена задача усовершенствования способа определения аномалии активации фермента, путем соединения исследуемой сыворотки крови с субстратом, в соотношении 10 : 1 и определения в полученной биологической смеси содержания свободных небелковых SH-групп, появление которых указывает на аномалию активации фермента, за счет чего обеспечивается повышение чувствительности способа и возможность определения скрытой аномалии активации фермента, а также сокращается время на исследование и значительно упрощается способ определения аномалии активации фермента.

Поставленная задача решается тем, что в заявляемом способе определения аномалии активации фермента, путем соединения исследуемой сыворотки крови с субстратом,

согласно изобретению, соединение исследуемой сыворотки крови с субстратом осуществляют в соотношении 10 : 1, после чего в полученной биологической смеси определяют содержание свободных небелковых SH-групп, появление которых указывает на аномалию активации фермента.

Анализ заявляемого технического решения позволил выявить следующие отличия:

изменение соотношения исследуемой сыворотки крови и субстрата;

определение аномалии активации фермента по появлению свободных небелковых SH-групп.

Известен способ определения аномалии активации фермента по изменению оптической плотности, однако он не позволяет выявлять скрытые аномалии активации фермента, и в отличие от известного способа, предлагаемый нами способ выявляет скрытую аномалию активации фермента. Причем авторами найдено количественное выражение аномалии активации фермента по появлению свободных небелковых SH-групп, которое представляет собой необходимое и достаточное условие для раннего выявления скрытой аномалии активации фермента.

Известно, что для диагностики ишемической болезни сердца (ИБС) осуществляют соединение сыворотки крови с адреналином, в результате чего появляются свободные небелковые SH-группы, свидетельствующие о наличии ИБС (Заявка на изобретение от 30.05.97), но неизвестно появление свободных небелковых SH-групп в биологической смеси, полученной путем соединения сыворотки крови с субстратом в соотношении 10 : 1, по которому судят об аномалии активации фермента.

Таким образом, совокупность отличительных признаков, предложенных в заявленном способе, обеспечивает достижение положительного эффекта, а именно - повышение чувствительности способа определения аномалии активации фермента, что находит выражение:

1) в идентификации скрытой аномалии активации фермента;

2) в повышении специфичности способа, определения аномалии активации фермента.

Кроме того, анализ чувствительности, заявляемого нами способа и способа-прототипа, показал, что аномалия активации фермента параллельно обнаружена во всех образцах как предлагаемым нами способом, таки способом-прототипом. Это свидетельствует, что определение аномалии активации фермента, предлагаемым нами способом, совпадает со способом-прототипом.

О более высокой чувствительности предлагаемого нами способа свидетельствуют данные, согласно которым аномалия активации фермента определяется в исследуемой сыворотке крови отдельных больных, у которых аномалия активации фермента способом-прототипом не определяется.

Сущность изобретения заключается в том, что осуществляют соединение исследуемой сыворотки крови с субстратом в соотношении 10 : 1, после чего в полученной биологической смеси определяют содержание свободных небелковых SH-групп, появление которых указывает на аномалию активации фермента. Причем, для

создания оптимального стехиомического соотношения между реагирующими центрами фермента с субстратом нами опытным путем выбрано указанное соотношение исследуемой сыворотки и субстрата которое составило 10 : 1.

Феномен появления свободных небелковых SH-групп, свидетельствующий о денатурационных превращениях фермента при его взаимодействии с субстратом в исследуемой сыворотке крови, в литературе не описан, как и не описан способ определения скрытой аномалии активации фермента в сыворотке крови, основанный на выявлении указанного феномена.

Нами установлено, что в норме, у здоровых лиц в сыворотке крови при взаимодействии фермента с субстратом, в полученной биологической смеси не появляются свободные небелковые SH-группы, что указывает на отсутствие аномалии его активации.

Кроме того, нами обнаружено, что в случае аномалии активации фермента в исследуемой сыворотке крови больных при ее соединении с субстратом, в полученной биологической смеси появляются свободные небелковые SH-группы, что указывает на аномалию активации фермента.

Мы исходили из того, что с общепатологической точки зрения специфическое повреждение белковой молекулы, в том числе и фермента - это ее денатурация (Адо А.Д. Вопросы общей нозологии. - М.: Медицина, 1985. - С.7). Каждое повреждение начинается с изменения в строении и свойствах разных молекул в клетках и тканях организма (Белицер В.А. // Укр. биохим. журн. - 1962. - Т.24. - В.2. - С.290).

В молекулярном аспекте специфическое повреждение характеризуется нарушением сил сцепления между полипептидами и нарушением их пространственной конфигурации, т.е. вторичной, третичной и четвертичной структуры белков (ферментов), упорядоченности их макроструктуры - денатурации (Жоли М. Физическая химия денатурации белков. - М., 1968. - С.3 - 21).

В результате денатурационных превращений белков (ферментов) повышается реакционная способность их функциональных групп, в том числе и белковых сульфогидрильных групп (Белицер В.А. // Укр. биохим. журн. - 1962. - Т.24. - В.2. - С.290).

Вместе с тем, данных относительно нарушения прочности связи небелковых SH-групп с белком (ферментом) в процессе его денатурационных превращений, в литературе мы не обнаружили, как и не обнаружили сведений относительно феномена появления свободных небелковых SH-групп в процессе биологической реакции фермент-субстрат и использования его при определении аномалии активации фермента.

В этом плане большой интерес представляют данные литературы (Капланский С.Я., Азявич А.В. // Вопр. мед. хим. - 1962. - Т.8. - №1. - С.53 - 58), согласно которым в сыворотке крови отсутствуют и не определяются свободные небелковые SH-группы. Это объясняется тем, что они находятся не в свободном, а в связанном с белком состоянии, о чем указывают результаты исследований (Modig H. // J. Biochem. - 1966. - 60. - №5. - Р.496). Автор считает, что факт образования смешанных комплексов между белком и низкомолекулярными тиолами,

например, глутатионом свидетельствует о их важной роли в регуляции структуры белковых молекул, в том числе и ферментов, которые могут выступать также в качестве депо низкомолекулярных тиолов.

При разработке заявляемого способа мы исходили из полученных нами длимых, согласно которым обнаружено появление свободных небелковых SH-групп в сыворотке крови при денатурационных превращениях белковых молекул, в том числе и ферментов. Денатурационные превращения указывают на аномалию активации фермента в процессе его биологической реакции с субстратом. В этом плане есть все основания считать, что при денатурации белков, в том числе и ферментов сыворотки крови местом их "полома" могут быть дисульфидные мостики. При специфическом повреждении белковых молекул, в том числе и ферментов, из-за разрыва смешанных дисульфидных связей между ними и низкомолекулярными тиолами могут появляться свободные небелковые SH-группы.

Указанное выше и явилось предпосылкой для изучения молекулярных тиолопривных механизмов денатурационных превращений фермента в процессе его биологической реакции с субстратом и разработки заявляемого нами способа.

Предлагаемый нами способ осуществляется следующим образом. У обследуемого, с соблюдением правил асептики, производят забор венозной крови в сухую стерильную пробирку и доставляют в лабораторное отделение. Согласно поставленной лабораторно-диагностической задачи обрабатывают и готовят сыворотку крови общепринятым способом и выбирают необходимый субстрат для постановки соответствующей ферментативной реакции. В исследуемой сыворотке крови первоначально определяют спонтанное содержание свободных небелковых SH-групп методом амперометрического титрования (АМТ) на разработанном нами устройстве для АМТ (Заявка на изобретение 96124935, приоритет от 27.12.96). После чего, в новый образец этой же исследуемой сыворотки крови добавляют необходимый субстрат в соотношении 10 : 1 и производят термостатирование такой биологической смеси при температуре 37°C в течение времени необходимого для протекания ферментативной реакции. Затем в такой биологической смеси: сыворотка крови - субстрат исследуют содержание свободных небелковых SH-групп методом АМТ, появление или повышение содержания которых указывает на аномалию активации фермента.

При определении аномалии активации фермента по предлагаемому нами способу использовались коммерческие диагностические наборы фирмы Lachema (Чехия), подготовка и разведение которых проводились согласно прилагаемой к набору инструкции. Для определения аномалии активации АсАТ использовалась смесь α -кетоглутаровой кислоты и D,L-аспаргиновой кислоты, для определения аномалии активации АлАТ - смесь γ -кетоглутаровой кислоты и D,L-аланина, для определения аномалии активации γ -глутамилтранспептидазы (γ -ГТП) - L- γ -глутамил-р-

нитроанилин; для определения аномалии активации щелочной фосфатазы - динатриевая соль фенилфосфата.

Для сравнения способов определения аномалии активации фермента, исследования проводились предлагаемым нами способом и способом-прототипом.

Нами было обследовано 69 больных, из которых у 14 человек был установлен диагноз стабильная стенокардия напряжения различных функциональных классов, у 16 - нестабильная стенокардия, у 23 - острый инфаркт миокарда в разные сроки заболевания, у 6 - инфекционно-аллергический миокардит, у 10 - вирусный гепатит А, желтушная форма, стадия разгара.

Контрольную группу составили 40 здоровых человек (доноры).

Получены следующие результаты.

Установлено, что в норме, у здоровых лиц, в сыворотке крови при взаимодействии фермента с субстратом, в полученной биологической смеси не появляются свободные небелковые SH-группы, что указывает на отсутствие аномалии активации фермента. Способом-прототипом аномалия активации фермента также не определялась.

Установлено, что в группе больных, в сыворотке крови при взаимодействии фермента с субстратом, в полученной биологической смеси появляются свободные небелковые SH-группы, что указывает на аномалию активации фермента. Способом-прототипом также определялась аномалия активации фермента.

Кроме того, установлено, что у отдельных больных, в сыворотке крови при взаимодействии фермента с субстратом, в полученной биологической смеси появляются свободные небелковые SH-группы, что указывает на аномалию активации фермента, а способом-прототипом аномалия активации фермента не была выявлена.

Проведено изучение чувствительности способа-прототипа и заявляемого нами способа определения аномалии активации фермента, сравнительные результаты которых представлены в таблице.

Как видно из таблицы, заявляемый нами способ определения аномалии активации фермента превосходит по чувствительности способ-прототип.

Пример 1. У донора Ф-ва, с соблюдением правил асептики, производили забор венозной крови в сухую стерильную пробирку. Сыворотку крови получали общепринятым способом. В исследуемой сыворотке крови первоначально определяли спонтанное содержание свободных небелковых SH-групп, которое составило 0мкМ/л. Затем, к 900мкЛ новой порции этой же сыворотки крови добавляли 100мкЛ субстрата для определения аномалии активации АлАТ. Производили термостатирование такой биологической смеси при температуре 37°C, в течение 30 минут. После этого в исследуемой биологической смеси определяли свободные небелковые SH-группы, содержание которых так же составило 0мкМ/л, что указывало на отсутствие аномалии активации фермента АлАТ.

При определении способом-прототипом активность АлАТ сыворотки крови у донора Ф-ва составила 25U/L (норма от 5 до 40U/L), что также указывало на отсутствие аномалии активации

фермента АлАТ.

Пример 2. Больной О-в, 1927 года рождения, доставлен в кардиореанимационное отделение 411 ОБГ 29.08.96г., в 10 часов 25 минут с диагнозом: Ишемическая болезнь сердца, острый крупноочаговый заднедиафрагмальный инфаркт миокарда; диффузный мелкоочаговый кардиосклероз с нарушением ритма и проводимости. Заболел остро, 29.08.96г. в 6 часов.

С соблюдением правил асептики у больного О-ва производили забор венозной крови в сухую стерильную пробирку в 10 часов 40 минут 29.08.96г., т.е. спустя 4 часа 40 минут от начала заболевания. Сыворотку крови получали общепринятым способом. В исследуемой сыворотке крови первоначально определяли спонтанное содержание свободных небелковых SH-групп, которое составило 17мкМ/л. Затем, к 900мкЛ новой порции этой же сыворотки крови добавляли 100мкЛ субстрата для определения аномалии активации АсАТ. Производили термостатирование такой биологической смеси при температуре 37°C, в течение 30 минут. После этого в исследуемой биологической смеси определяли свободные небелковые SH-группы, содержание которых составило 34мкМ/л, что указывало на аномалию активации фермента АсАТ.

При определении способом-прототипом активность АсАТ сыворотки крови у больного О-ва составила 31U/L (норма от 5 до 40U/L), что указывало на отсутствие аномалии активации фермента АсАТ.

Пример 3. У этого же больного О-ва, спустя 48 часов от начала заболевания с соблюдением правил асептики, производили повторный забор венозной крови в сухую стерильную пробирку. Получали сыворотку крови общепринятым способом. В исследуемой сыворотке крови первоначально определяли спонтанное содержание свободных небелковых SH-групп, которое составило 21мкМ/л. Затем, к 900мкЛ новой порции этой же сыворотки крови добавляли 100мкЛ субстрата для определения аномалии активации АсАТ. Производили термостатирование такой биологической смеси при температуре 37°C, в течение 30 минут. После этого в исследуемой биологической смеси определяли свободные небелковые SH-группы, содержание которых составило 52мкМ/л, что указывало на аномалию активации фермента АсАТ.

При определении способом-прототипом активность АсАТ сыворотки крови у больного О-ва составила 205U/L (норма от 5 до 40U/L), что также указывало на аномалию активации фермента АсАТ.

Пример 4. У этого же больного О-ва, на 45 - е сутки от начала заболевания с соблюдением правил асептики, производили повторный забор венозной крови в сухую стерильную пробирку. Получали сыворотку крови общепринятым способом. В исследуемой сыворотке крови первоначально определяли спонтанное содержание свободных небелковых SH-групп, которое составило 0мкМ/л. Затем, к 900мкЛ новой порции этой же сыворотки крови добавляли 100мкЛ субстрата для определения аномалии активации АсАТ. Производили термостатирование такой биологической смеси при температуре 37°C,

в течение 30 минут. После этого в исследуемой биологической смеси определяли свободные небелковые SH-группы, содержание которых составило 0мкМ/л, что указывало на отсутствие аномалии активации фермента АсАТ.

При определении способом-прототипом активность АсАТ сыворотки крови у больного О-ва составила 37U/L. (норма от 5 до 40U/L), что также указывало на отсутствие аномалии активации фермента АсАТ.

Пример 5. Больной М-в, 1948 года рождения, доставлен в кардиореанимационное отделение 411 ОБГ 06.05.97г., в 20 часов 15 минут с диагнозом: Ишемическая болезнь сердца, нестабильная стенокардия.

С соблюдением правил асептики производили забор венозной крови в сухую стерильную пробирку. Сыворотку крови получали общепринятым способом. В исследуемой сыворотке крови первоначально определяли спонтанное содержание свободных небелковых SH-групп, которое составило 0мкМ/л. Затем, к 900мкЛ новой порции этой же сыворотки крови добавляли 100мкЛ субстрата для определения аномалии активации АсАТ. Производили термостатирование такой биологической смеси при температуре 37°C, в течение 30 минут. После этого в исследуемой биологической смеси определяли свободные небелковые SH-группы, содержание которых составило 12мкМ/л, что указывало на аномалию активации фермента АсАТ.

При определении способом-прототипом активность АсАТ сыворотки крови у больного О-ва составила 34U/L (норма от 5 до 40U/L), что указывало на отсутствие аномалии активации фермента.

Пример 6. Больной Т-н, 1976 года рождения, доставлен в инфекционное отделение 411 ОБГ 07.03.97г. с диагнозом: Вирусный гепатит А, желтушная форма, стадия разгара, тяжелое течение.

С соблюдением правил асептики производили забор венозной крови в сухую стерильную пробирку. Сыворотку крови получали общепринятым способом. В исследуемой сыворотке крови первоначально определяли спонтанное содержание свободных небелковых SH-групп, которое составило 0мкМ/л. Затем, к 900мкЛ новой порции этой же сыворотки крови добавляли 100мкЛ субстрата для определения аномалии активации АлАТ. Производили термостатирование такой биологической смеси при температуре 37°C, в течение 30 минут. После этого в исследуемой биологической смеси определяли свободные небелковые SH-группы, содержание которых составило 42мкМ/л, что указывало на аномалию активации фермента АлАТ.

При определении способом-прототипом активность АлАТ сыворотки крови у больного Т-на составила 842U/L (норма от 5 до 40U/L), что также указывало на аномалию активации фермента АлАТ.

Пример 7. У этого же больного, Т-на 1976г.р., с соблюдением правил асептики производили забор венозной крови в сухую стерильную пробирку 07.03.97г. Сыворотку крови получали общепринятым способом. В исследуемой сыворотке крови первоначально определяли

спонтанное содержание свободных небелковых SH-групп, которое составило 0мкМ/л. Затем, к 900мкЛ новой порции этой же сыворотки крови добавляли 100мкЛ субстрата для определения аномалии активации γ -глутамилтрансферазы. Производили термостатирование такой биологической смеси при температуре 37°C, в течение 5 минут. После этого в исследуемой биологической смеси определяли свободные небелковые SH-группы, содержание которых составило 33мкМ/л, что указывало на аномалию активации фермента γ -глутамилтрансферазы.

При определении способом-прототипом активность γ -глутамилтрансферазы сыворотки крови у больного Т-на составила 12,6мкмоль/ч мл (норма от 0,9 до 6,4мкмоль/ч мл), что также указывало на аномалию активации фермента γ -глутамилтрансферазы.

Примере. Больной И-ко, 1976 года рождения, доставлен в отделение неотложной хирургии 411 ОБГ 12.01.97г. с диагнозом: Хронический персистирующий гепатит, желчекаменная болезнь, печеночная колика.

С соблюдением правил асептики производили забор венозной крови в сухую стерильную пробирку. Сыворотку крови получали общепринятым способом. В исследуемой сыворотке крови первоначально определяли спонтанное содержание свободных небелковых SH-групп, которое составило 0мкМ/л. Затем, к 900мкЛ новой порции этой же сыворотки крови добавляли 100мкЛ субстрата для определения аномалии активации щелочной фосфатазы. Производили термостатирование такой биологической смеси при температуре 37°C, в течение 10 минут. После этого в исследуемой биологической смеси определяли свободные небелковые SH-группы, содержание которых составило 37мкМ/л, что указывало на аномалию активации фермента щелочной фосфатазы.

При определении способом-прототипом активность щелочной фосфатазы сыворотки крови у больного И-ко составила 4200нмоль/с л (норма от 900 до 2290нмоль/с л), что также указывало на аномалию активации фермента.

Таким образом, заявляемый нами способ позволяет по появлению свободных небелковых SH-групп определять в сыворотке крови аномалию активации фермента.

Полученные данные свидетельствуют о том, что заявляемый нами способ, по сравнению со способом-прототипом, является более чувствительным, информативным, обладает высокой диагностической ценностью, т.к. позволяет определять скрытую аномалию активации фермента. Кроме того, он прост в исполнении и значительно упрощает проведение исследования с целью определения аномалии активации фермента.

Таблица

Сравнительная оценка предлагаемого способа и способа-прототипа

Группы обследованных	Выявлена аномалия активации фермента (абс.)							
	Предлагаемым способом				Способом-прототипом			
	АлАТ	АсАТ	ЩФ	γ-ГТП	АлАТ	АсАТ	ЩФ	γ-ГТП
Доноры (n=40)	0	0	0	0	0	0	0	0
Стабильная стенокардия напряжения I-III функционального класса (n=14)	0	0	0	0	10	10	14	0
Нестабильная стенокардия (n=16)	0	0	2	2	13	15	14	14
Острый инфаркт миокарда 1-12 час от начала заболевания (n=8)	1	2	0	0	5	8	4	0
Острый инфаркт миокарда 12-72 часа от начала заболевания (n=12)	2	8	5	4	8	12	10	7
Острый инфаркт миокарда 4-45 суток от начала заболевания (n=3)	0	0	0	0	3	3	3	3
Инфекционно-аллергический миокардит (n=6)	0	0	6	0	0	3	6	0
Вирусный гепатит А (n=10)	8	4	4	5	10	9	8	10