



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **71210**

(13) **U**

(51) МПК

G01N 33/48 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2011 14391**

(22) Дата подання заявки: **05.12.2011**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **10.07.2012**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **10.07.2012, Бюл.№ 13**

(72) Винахідник(и):

**Сербіна Ірина Євгенівна (UA),
Нікуліна Галина Григорівна (UA),
Мигаль Людмила Якимівна (UA),
Пирогов Віктор Олексійович (UA),
Нікітаєв Сергій Вікторович (UA),
Негрей Лариса Миколаївна (UA)**

(73) Власник(и):

**ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ
УРОЛОГІЇ НАМН УКРАЇНИ",
вул. Ю. Коцюбинського, 9-а, м. Київ, 04053
(UA)**

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ γ -ГЛЮТАМІЛТРАНСПЕПТИДАЗИ В ПАРЕНХІМІ НИРКИ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

(57) Реферат:

Спосіб визначення активності γ -глутамілтранспептидази в паренхімі нирки в експерименті включає вимірювання пара-нітроаніліну, утвореного в ході переносу ферментом L- γ -глутамілового залишку з L- γ -глутаміл-пара-нітроаніліну на дипептидний акцептор гліцил-гліцин та за кількістю звільненого за одиницю часу пара-нітроаніліну визначають активність γ -глутамілтранспептидази. Вимірювання проводять в 25 %-му розчині гомогенату паренхіми нирки, додатково розведеному фізіологічним розчином в 101 раз до екстинкції, максимально допустимої калібрувальним графіком.

UA 71210 U

Спосіб належить до медицини, а саме до урології, нефрології та клінічної біохімії, і може бути використаним для оцінки особливостей метаболічних процесів, які можуть бути змодельовані в експерименті в паренхімі нирки.

В основі лікування багатьох патологічних станів нирки лежать ішемічні процеси. Порухення внутрішньониркової гемодинаміки, наслідком якої є гіпоксія, призводить до цілого каскаду патологічних процесів, зокрема до дисметаболізму, спричиненому дистрофічно-деструктивними змінами клітинних елементів ниркової паренхіми, що в результаті веде до розвитку ниркової недостатності, тому постає задача конкретизувати, які саме порушення відбуваються при ішемії в паренхімі нирки і, зокрема, в її функціональній одиниці - нефроні. Чутливими маркерами ушкодження нефротелію є ферменти, і вивчення їх активності дає змогу оцінити ступінь ураження паренхіми нирки.

Одним з ферментів, що має високу активність в нирковій тканині, є γ -глютамілтранспептидаза (КФ 2.3.2.2), що пов'язана з плазматичною мембраною клітин щіткової облямівки звивистих каналців, при цьому її активність в нирках в 7000 разів вища за активність в сироватці крові.

Відомий уніфікований метод визначення активності γ -глютамілтранспептидази в сироватці крові [1], що взятий за прототип, який базується на вимірюванні пара-нітроаніліну, утвореного в ході переносу ферментом L- γ -глютамілового залишку з L- γ -глютаміл-пара-нітроаніліну на дипептидний акцептор гліцил-гліцин та за кількістю звільненого за одиницю часу пара-нітроаніліну судять про активність γ -глютамілтранспептидази в сироватці крові, при чому, якщо активність ферменту вище 5000 нмоль/сек.хл, що за калібрувальним графіком відповідає екстинкції 0,382, пробу розводять фізіологічним розчином.

Недоліком способу є те, що визначення активності γ -глютамілтранспептидази проводять в сироватці крові.

В основу корисної моделі поставлено задачу удосконалити спосіб визначення активності γ -глютамілтранспептидази в паренхімі нирки в експерименті шляхом вимірювання пара-нітроаніліну, утвореного в ході переносу ферментом L- γ -глютамілового залишку з L- γ -глютаміл-пара-нітроаніліну на дипептидний акцептор гліцил-гліцин та за кількістю звільненого за одиницю часу пара-нітроаніліну визначають активність γ -глютамілтранспептидази в гомогенаті паренхіми нирки розведеного фізіологічним розчином; оскільки гомогенат суттєво відрізняється від сироватки крові за фізико-хімічними властивостями, а саме прозорістю, оптичною густиною і надто високою активністю цього ензиму в нирковій тканині, готують 25 %-ий розчин гомогенату паренхіми нирки, який розводять в подальшому до максимально допустимої калібрувальним графіком екстинкції в 101 раз, що дасть можливість оцінити особливості метаболічних процесів різних патологічних станів, які можуть бути змодельовані в паренхімі нирки в експерименті.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб визначення активності γ -глютамілтранспептидази в паренхімі нирки в експерименті, який включає вимірювання пара-нітроаніліну, утвореного в ході переносу ферментом L- γ -глютамілового залишку з L- γ -глютаміл-пара-нітроаніліну на дипептидний акцептор гліцил-гліцин та за кількістю звільненого за одиницю часу пара-нітроаніліну визначають активність γ -глютамілтранспептидази, згідно з корисною моделлю, вимірювання проводять в 25 %-му розчині гомогенату паренхіми нирки, додатково розведеному фізіологічним розчином в 101 раз до екстинкції, максимально допустимої калібрувальним графіком.

Запропонований спосіб виконують наступним чином: в експерименті у кроля вилучають дослідну нирку, з паренхіми якої готують 25 % розчин гомогенату в розведенні 1:3, для чого тканину паренхіми нирки ретельно розтирають на холоді в скляному гомогенізаторі і до 1 г розтертої ниркової тканини додають 3,0 мл фізіологічного розчину, одержаний в такий спосіб 25 %-ний розчин гомогенату центрифугують 15 хвилин при 1500 об/хв., з надосадової рідини готують робочий розчин розведенням в 101 раз 25 %-ного гомогенату (до 2,0 мл фізіологічного розчину додають 0,02 мл надосадової рідини). Цілковита прозорість і безбарвність розведеного гомогенату дозволяє уникнути отримання хибно підвищених результатів, які виникають внаслідок надмірної каламутності або забарвлення досліджуваного біологічного середовища. Надалі в пробірку з 0,5 мл стандартного субстратно-буферного розчину додають 0,05 мл робочого розчину гомогенату, перемішують і інкубують 15 хвилин при 37 °С. Після інкубації ферментативну реакцію припиняють додаванням 3 мл 10 % оцтової кислоти. Контрольну пробу ставлять так само, як і дослідну, але біоматеріал додають після інкубації. Вимірюють екстинкцію дослідної проби проти контрольної при довжині хвилі 400-430 нм в кюветі з довжиною оптичного шляху 1 см. Визначення активності γ -глютамілтранспептидази в гомогенаті проводять за калібрувальним графіком, для побудови якого зі стандартного розчину пара-нітроаніліну готують розведення відповідно з інструкцією до стандартного набору. При розрахунку

активності γ -глутамілтранспептидази в паренхімі нирки враховують розведення гомогенату в 101 раз і концентрацію самого гомогенату (25 %). Активність γ -глутаміл-транспептидази в гомогенаті визначають за кількістю звільненого за одиницю часу пара-нітроаніліну та вимірюють в мкмоль/сек.хл (мкат/л), активність ферменту в паренхімі нирки розраховують на 1 г сирової тканини та виражають в нмоль/сек.хг тканини (нкат/г тканини).

Апробацію способу, що заявляється, проведено в лабораторіях біохімії та нейроурології ДУ "Інститут урології НАМН України". Дослідження проведені на 35 експериментальних тваринах - кролях, статевозрілих самцях вагою у середньому $3,2 \pm 0,05$ кг.

Для визначення оптимального ступеня розведення 25 %-ого гомогенату визначення проводили в: в нерозведеному 25 %-ому гомогенаті; в розведеному в 5 разів (0,5 мл 25 % гомогенату + 2,0 мл фізіологічного розчину, тобто у співвідношенні 1:4); в розведеному в 20 разів (0,1 мл 25 % гомогенату + 1,9 мл фізіологічного розчину, тобто у співвідношенні 1:19); в розведеному в 51 раз (0,02 мл 25 % гомогенату + 1,0 мл фізіологічного розчину, тобто у співвідношенні 1:50); в розведеному в 101 раз (0,02 мл 25 % гомогенату + 2,0 мл фізіологічного розчину, тобто у співвідношенні 1:100).

Отримані результати визначення активності γ -глутамілтранспептидази в гомогенаті паренхіми нирки кроля № 1 (протокол від 18.01.2008) наводимо в таблиці.

Таблиця

Залежність визначеної активності γ -глутамілтранспептидази в гомогенаті паренхіми нирки кроля від ступеня розведення гомогенату

Показники	25 % гомогенат	25 % гомогенат, розведений в			
		5 раз	20 раз	51 раз	101 раз
Екстинкція	0,685*	0,708*	0,580*	0,376	0,220
Активність ферменту в пробі без урахування розведення (в нмоль/сек.хл)	8966,0**	9267,0**	7591,6**	4767,7	2444,4
Активність ферменту з урахуванням розведення (в мкмоль/сек.хл)	9,0	46,3	151,8	243,0	247,1

* - величина екстинкції перевищує максимально допустимий рівень;

** - активність ферменту перевищує максимально допустиму.

Як свідчать представлені в таблиці результати, використання нерозведеного 25 %-ого гомогенату та розведення його в 5 та 20 разів дають хибно занижені показники активності γ -глутамілтранспептидази в гомогенаті паренхіми нирки, що пояснюється надто інтенсивним забарвленням проби і, відповідно, дуже високою екстинкцією. Вимога розводити біопробу з активністю вище за 5000 нмоль/сек.хл продиктована невідповідністю кількості субстрату в пробірці надто високій активності γ -глутамілтранспептидази в пробі.

Розведення в 51 та 101 разів в кінцевому перерахунку дають практично однакові результати, проте в пробі, розведеної в 51 раз, екстинкція та активність ферменту без урахування розведення знаходяться на межі максимально допустимого калібрувальним графіком рівня. Таким чином, розведення 25 %-ного гомогенату в 101 раз є самим оптимальним для визначення активності γ -глутамілтранспептидази в гомогенаті паренхіми нирки кроля.

Наводимо приклад застосування запропонованого способу.

Приклад. Із тканини коркового шару нирки кроля № 47 (протокол від 19.10.10 р.), згідно із запропонованим способом, готують 25 %-ний гомогенат, надосадову рідину розводять в 101 раз (до 2 мл фізіологічного розчину додають 0,02 мл надосадової рідини 25 % гомогенату), визначають активність γ -глутамілтранспептидази, яка становить 1811,11 нмоль/сек.хл. В вихідному 25 %-ному гомогенаті активність ферменту буде в 101 раз вище, відповідно 182,92 мкмоль/сек.хл. Для обчислення активності ферменту в 1 грамі тканини паренхіми нирки враховують 25 % концентрацію гомогенату: в 100 г гомогенату міститься 25 г ниркової тканини, що відповідає концентрації 250 г/л. В перерахунку на 1 г ниркової тканини активність γ -глутамілтранспептидази буде в 250 разів менше, ніж 182,92 мкмоль/сек.хл, тобто 731,68 нм/схг ниркової тканини (нкат/г ниркової тканини).

Таким чином, спосіб визначення активності γ -глутамілтранспептидази в паренхімі нирки є інформативним, нескладним у виконанні, добре відтворюваним (коефіцієнт варіабельності способу не перевищує $\pm 5,7\%$) і потребує невеликої кількості біологічного матеріалу.

Джерела інформації:

- 5 1. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике [Текст]. Т. 1: справочник / В.С. Камышников.-2-е изд. - Мн.: Беларусь, 2002. - 463 с.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 10 Спосіб визначення активності γ -глутамілтранспептидази в паренхімі нирки в експерименті, який включає вимірювання пара-нітроаніліну, утвореного в ході переносу ферментом L- γ -глутамілового залишку з L- γ -глутаміл-пара-нітроаніліну на дипептидний акцептор гліцил-гліцин та за кількістю звільненого за одиницю часу пара-нітроаніліну визначають активність γ -глутамілтранспептидази, який **відрізняється** тим, що вимірювання проводять в 25 %-му розчині гомогенату паренхіми нирки, додатково розведеному фізіологічним розчином в 101 раз до екстинкції, максимально допустимої калібрувальним графіком.
- 15

Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601