



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **83116**

(13) **U**

(51) МПК

G01N 33/48 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2013 03096**

(22) Дата подання заявки: **13.03.2013**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **27.08.2013**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **27.08.2013, Бюл.№ 16**

(72) Винахідник(и):

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

(73) Власник(и):

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

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ N-АЦЕТИЛ- β -D-ГЛЮКОЗАМІНІДАЗИ В ПАРЕНХІМІ НИРКИ

(57) Реферат:

Спосіб визначення активності N-ацетил- β -D-глюкозамінідази в паренхімі нирки включає додавання до 2,5 % розчину гомогенату коркового шару паренхіми нирки цитратного буферу та розчину субстрату, інкубацію реакційної суміші при 37 °C, припинення ферментативної реакції додаванням розчину вуглекислого натрію, визначення оптичної щільності отриманої проби фотокolorиметричним методом та обчислення одержаного результату з урахуванням кількості мг білка у біологічному матеріалі. В паренхімі нирки визначають активність лізосомного ферменту N-ацетил- β -D-глюкозамінідази, інкубацію реакційної суміші здійснюють протягом 15 хвилин. Проби після припинення ферментативної реакції фільтрують, отриманий результат ферментативної реакції розраховують на 1 г сирової тканини коркового шару паренхіми нирки.

UA 83116 U

Спосіб стосується галузі медицини, а саме урології, нефрології та біохімії, призначений для дослідження функціонального стану паренхіми нирки, зокрема канальцевого нефротелію, і може бути використаним для діагностики, прогнозування перебігу та оцінки ефективності лікування хвороб нирок як в експерименті, так і в клініці.

Інтенсивність метаболічних процесів у паренхімі нирки, як відомо, повністю залежить від її кровопостачання, навіть незначне порушення якого одразу ж відбивається на функціональному стані її структурної одиниці - нефрону, а також і на рівнях активності тих ферментних систем, що приймають безпосередню участь у формуванні первинної сечі, тобто у процесах сечоутворення. Серед ферментних систем тубулярного епітелію нефрону найбільш діагностично значущим є дослідження гідролітичних ферментів лізосомного походження, особливо тих ферментів, які у високій концентрації є вміщеними в тканині паренхіми нирки.

Саме до таких лізосомних гідролаз належить фермент N-ацетил- β -D-глюкозамінідаза, що у тубулярному відділі нефрону приймає безпосередню участь у гідролізі N-ацетилглюкозамінідів та N-ацетилгалактозамінідів з утворенням нередукуючих кінцевих залишків β -N-ацетилглюкозаміну у таких складних біополімерах як гліколіпіди та глікозаміноглікани, а за внутрішньолізосомною локалізацією є частково структурованою у мембрані цієї органели.

Відомий спосіб визначення рівнів активності лізосомного ферменту N-ацетил- β -D-глюкозамінідази в сечі, що отримана після фізіологічного сечовипускання, хворих на односторонній уролітіаз (1), який полягає в додаванні до нативної біологічної рідини - сечі - цитратного буферу та розчину субстрату, інкубації реакційної суміші при 37 °C протягом 30 хвилин, припиненні ферментативної реакції додаванням розчину вуглекислого натрію, визначенні оптичної щільності активності ферменту фотокolorиметричним методом та математичного обчислення результату у відносних одиницях з урахуванням чисельного виразу ммоль креатиніну у біологічному матеріалі.

Недоліком способу є те, що він адаптований тільки для визначення активності ферменту в сечі, і, відповідно, активність ферменту розраховують на 1 ммоль креатиніну сечі.

Найбільш близьким до способу, що заявляється, є спосіб визначення активності β -галактозидази в паренхімі нирки, взятий нами за прототип (2), в якому об'єктом дослідження є 2,5 % розчин гомогенату коркового шару паренхіми нирки, до якого додають цитратний буфер та розчин субстрату, здійснюють інкубацію реакційної суміші при 37 °C протягом 30 хвилин, припиняють ферментативну реакцію додаванням розчину вуглекислого натрію, визначають оптичну щільності активності ферменту фотокolorиметричним методом, а отриманий результат обчислюють з урахуванням кількості мг білка у біологічному матеріалі, вміст білка визначають біуретовим методом.

Недоліком способу є те, що він адаптований тільки для визначення в паренхімі нирки активності ферменту β -галактозидази, який, хоча і має лізосомне походження, за молекулярною масою, внутрішньоорганельною локалізацією та каталітичною активністю відрізняється від інших ферментів, зокрема ферменту N-ацетил- β -D-глюкозамінідази, також лізосомного походження, у тому числі за умовами його визначення. Крім того, додаткове використання біуретового методу, за допомогою якого розраховують вміст білка у біологічному матеріалі для обчислення кінцевого результату ферментативної реакції, не завжди є інформативним у зв'язку з тим, що гомогенати із ниркової паренхіми іноді бувають не зовсім прозорими за рахунок опалесценції, що впливає на чутливість методу.

В основу корисної моделі поставлена задача удосконалити спосіб визначення активності N-ацетил- β -D-глюкозамінідази в паренхімі нирки в експерименті шляхом використання для дослідження 2,5 % гомогенату коркового шару паренхіми нирки з додаванням цитратного буферу та розчину субстрату, здійснення інкубації реакційної суміші при 37 °C протягом 15 хвилин (враховуючи високу активність ферменту в нирковій тканині), фільтрування проб після припинення ферментативної реакції з метою отримання найбільш прозорої рідини, визначення оптичної щільності активності ферменту фотокolorиметричним методом та обчислення отриманого результату в абсолютних одиницях - на 1 г сирової тканини коркового шару паренхіми нирки з метою уникнення впливу додаткового методу дослідження - визначення вмісту білка біуретовим методом та підвищення таким чином чутливості запропонованого способу. Використання біологічного матеріалу в концентрації 2,5 % розчину, з одного боку, значно зменшує вплив інгібіторів та активаторів на досліджуваний фермент, а з другого - дозволяє визначати активність ферменту і в тому випадку, якщо біологічний матеріал є в обмеженій кількості, наприклад, біопсійний матеріал.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб визначення активності N-ацетил- β -D-глюкозамінідази в паренхімі нирки, який включає додавання до 2,5 % розчину гомогенату коркового шару паренхіми нирки цитратного буферу та розчину субстрату, інкубацію реакційної

суміші при 37 °С, припинення ферментативної реакції додаванням розчину вуглекислого натрію, визначення оптичної щільності отриманої проби фотоколориметричним методом та обчислення одержаного результату з урахуванням кількості мг білка у біологічному матеріалі, згідно з корисною моделлю, в паренхімі нирки визначають активність лізосомного ферменту N-ацетил-β-D-глюкозамінідази, інкубацію реакційної суміші здійснюють протягом 15 хвилин, проби після припинення ферментативної реакції фільтрують, отриманий результат ферментативної реакції розраховують на 1 г сирової тканини коркового шару паренхіми нирки.

Спосіб визначення активності N-ацетил-β-D-глюкозамінідази в паренхімі нирки виконують наступним чином: із отриманої наважки - 1 г сирової тканини коркового шару паренхіми нирки, готують 25 % розчин гомогенату, для чого тканину ретельно подрібнюють і розтирають скляним товчачиком в скляному гомогенізаторі, розміщеному у посудині із льодом, додають холодний (0-2 °С) 0,9 % фізіологічний розчин в об'ємі 1:3, тобто на 1 наважку тканини нирки додають 3 мл 0,9 % фізіологічного розчину, ретельно перемішують (важливо, що всі процедури з наважкою тканини коркового шару нирки виконують швидко та обов'язково на льоду), одержаний в такий спосіб 25 % розчин гомогенату тканини нирки далі розводять у 10 разів фізіологічним розчином, потім ретельно перемішують та центрифугують в центрифужній пробірці при 3000 об/хв. впродовж 10 хв. для осадження залишків тканини, надосадову рідину, що являє собою 2,5 % розчин гомогенату коркового шару паренхіми нирки, зливають у окрему пробірку; надалі в пробірку беруть 0,1 мл цього гомогенату і додають до них 0,4 мл 0,1 М цитратного буферу (рН 4,15) та 0,2 мл субстрату, який включає 10 мМ розчин 4-нітрофеніл-2-ацетамідо-2-дезоксид-β-D-глюкопіранозиду у 0,1 М цитратному буфері (рН 4,15). Проби інкубують 15 хвилин при 37 °С, після зупинення ферментативної реакції шляхом додавання 0,8 мл 0,1 М розчину вуглекислого натрію проби фільтрують. Оптичну щільність пара-нітрофенолу, що утворився в результаті ферментативної реакції, вимірюють на фотоелектроколориметрі при 400 нм в кюветах з товщиною шару 3 мм проти контрольної проби, в яку розчин субстрату вносять після припинення ферментативної реакції. Кількість пара-нітрофенолу, що утворився в результаті ферментативної реакції, визначають за калібрувальною кривою. Ферментативну активність N-ацетил-β-D-глюкозамінідази в паренхімі нирки з урахуванням ступеню розведення біоматеріалу розраховують у абсолютних одиницях - у мкмольх пара-нітрофенолу, що утворився протягом 1 години, із розрахунку на 1 г сирової тканини коркового шару паренхіми нирки.

Необхідність приготування та використання гомогенату паренхіми нирки досить низької концентрації - 2,5 % розчину, а потім використання його в пробі об'ємом в 0,1 мл та додавання 0,4 мл цитратного буферу, тобто додаткового його розведення ще в два рази, викликана високою активністю N-ацетил-β-D-глюкозамінідази в корковому шарі паренхіми нирки. Крім того, гомогенат тканини нирки в високій концентрації є густою та малопрозорою суспензією, і використання її в такому стані впливає на прозорість реакційної суміші, що, в свою чергу, може привести до отримання хибних результатів щодо активності ферменту через збільшення оптичної густини реакційної суміші. Розведення біоматеріалу значно зменшує також вплив на активність ферменту інгібіторів та активаторів, які можуть бути в концентрованому гомогенаті, що також збільшує вірогідність отримання достовірних результатів дослідження. Високою активністю N-ацетил-β-D-глюкозамінідази в корковому шарі паренхіми нирки викликана також необхідність інкубації реакційної суміші при 37 °С протягом 15 хвилин. Фільтрування проб після припинення ферментативної реакції викликано необхідністю одержання найбільш прозорої рідини перед фотоколориметруванням. Обчислення активності ферменту в абсолютних одиницях - із розрахунку на 1 г сирової тканини коркового шару паренхіми нирки у зв'язку з тим, що виключає використання додаткового методу дослідження та підвищує таким чином чутливість способу, також надає отриманим результатам більшої об'єктивності та більшої інформативності в оцінці функціонального стану паренхіми нирки, зокрема канальцевого нефротелію.

Практичне використання способу, що заявляється, проведено в лабораторії біохімії та в лабораторії нейроурології ДУ "Інститут урології НАМНУ". Дослідження проведені на 3 (6 нирок) практично здорових експериментальних тваринах - кролях, статевозрілих самцях вагою у середньому 3,2±0,05 кг.

Результати дослідження рівнів активності N-ацетил-β-D-глюкозамінідази в паренхімі нирки практично здорових тварин дорівнюють у середньому 98,92±6,90 мкмольх пара-нітрофенолу, що утворився протягом 1 год. інкубації при 37,0 °С із розрахунку на 1 г сирової тканини коркового шару паренхіми нирки. Точність способу: помилка у двох паралельних визначеннях не перевищує ±5,9 %.

Наводимо приклади застосування запропонованого способу.

Приклад 1

Із зразку тканини коркового шару паренхіми правої нирки кролика № 20 вагою 3100 г, протокол від 09.02.09 р., згідно запропонованого способу, готують 2,5 % розчин гомогенату та визначають активність N-ацетил-β-D-глюкозамінідази, яка становила 79,52 мкмолів паранітрофенолу, що утворився протягом 1 год. інкубації при 37,0 °C із розрахунку на 1 г сирої тканини (мкмоль/год./г сирої тканини).

Приклад 2

Із зразку тканини коркового шару паренхіми правої нирки кролика № 21 вагою 3250 г, протокол від 09.02.09 р., згідно запропонованого способу, готують 2,5 % розчин гомогенату та визначають активність N-ацетил-β-D-глюкозамінідази, яка становила 106,96 мкмолів паранітрофенолу, що утворився протягом 1 год. Інкубації при 37,0 °C із розрахунку на 1 г сирої тканини (мкмоль/год./г сирої тканини).

Спосіб, що заявляється, може бути використаним в експериментальних умовах для оцінки ефективності як медикаментозного, так і оперативного лікування нирки, дослідження особливостей метаболічних процесів за різних патологічних станів, які можуть бути змодельовані в паренхімі нирки при виконанні науково-дослідних робіт тощо, а також в умовах клініки для уточнення діагностики, можливого передбачення подальшого прогресування перебігу хвороби, поглибленого вивчення ступеня порушення функціонального стану паренхіми нирки за різних варіантів трансплантації нирки, після хірургічних операцій, а також можливо в разі необхідності при дослідженні прижиттєвого біопсійного матеріалу.

Таким чином, спосіб визначення активності N-ацетил-β-D-глюкозамінідази в паренхімі нирки є точним, інформативним, нескладним у виконанні, добре відтворюваним, потребує невеликої кількості біологічного матеріалу, дає об'єктивну оцінку отриманих результатів за рахунок обчислення активності ферменту у абсолютних одиницях (на 1 г сирої тканини коркового шару паренхіми нирки), коефіцієнт варіабельності способу не перевищує $\pm 5,9\%$.

Джерела інформації:

1. Пат. № 69689, UA, МПК, G01N 33/493 (2006.01), A61P 13/12 (2006.01). Спосіб діагностики ішемії паренхіми нирки у хворих на односторонній уролітіаз / С.О. Возіанов, В.В. Черненко, Л.Я. Мигаль, Г.Г. Нікуліна, Р.Є. Ладнюк, Н.І. Желтовська, А.Л. Ключ, І.Є. Сербіна, Л.М. Негрей, В.Й. Савчук; ДУ "ІУАМНУ"; № u201112366, 21.10.2011. Опубл. 10.05. 2012, Бюл. № 9. - 4 с.

2. Пат. № 36030, UA, МПК(2006), G01N 33/483. Спосіб визначення активності β-галактозидази в паренхімі нирки / В.О. Пирогов, Л.Я. Мигаль, Г.Г. Нікуліна, С.В. Нікітаєв; ДУ "ІУАМНУ"; № u200806285, 13.05.2008. Опубл. 10.10. 2008, Бюл. № 19. - 3 с. (прототип).

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб визначення активності N-ацетил-β-D-глюкозамінідази в паренхімі нирки, який включає додавання до 2,5 % розчину гомогенату коркового шару паренхіми нирки цитратного буферу та розчину субстрату, інкубацію реакційної суміші при 37 °C, припинення ферментативної реакції додаванням розчину вуглекислого натрію, визначення оптичної щільності отриманої проби фотоколориметричним методом та обчислення одержаного результату з урахуванням кількості мг білка у біологічному матеріалі, який **відрізняється** тим, що в паренхімі нирки визначають активність лізосомного ферменту N-ацетил-β-D-глюкозамінідази, інкубацію реакційної суміші здійснюють протягом 15 хвилин, проби після припинення ферментативної реакції фільтрують, отриманий результат ферментативної реакції розраховують на 1 г сирої тканини коркового шару паренхіми нирки.

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

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