



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **117474** (13) **U**
(51) МПК
G01N 33/68 (2006.01)
G01N 21/79 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2017 00721	(72) Винахідник(и): Блажеєвський Микола Євстахійович (UA), Ковальська Олена Василівна (UA), Дядченко Владислав Валерійович (UA)
(22) Дата подання заявки: 26.01.2017	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 26.06.2017	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 26.06.2017, Бюл.№ 12	(73) Власник(и): НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, вул. Пушкінська, 53, м. Харків, 61002 (UA)

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ХОЛІНЕСТЕРАЗИ КРОВІ

(57) Реферат:

Спосіб визначення активності холінестерази крові полягає у фотометричному вимірюванні швидкості ензимного гідролізу субстрата ацетилхоліну за його залишком у середовищі буферу з використанням індикатора на ацильну групу. Як індикатор на ацильну групу використовують п-фенетидин при рН 8,35, а швидкість ензимного гідролізу ацетилхоліну вимірюють за тангенсом кута нахилу лінійної ділянки кінетичної кривої за довжини хвилі 358 нм.

UA 117474 U

Корисна модель належить до галузі медичної біохімії, а саме до методів дослідження біохімічних процесів, зокрема до способів визначення активності холінестерази крові (ChE) і може знайти застосування у клініко-біохімічних лабораторіях для діагностики живих організмів ссавців, вражених речовинами антихолінестеразної дії, а також для діагностики та з'ясування

ступеня тяжкості хворого гепатитом, цирозом, або саркомою з метастазами у печінці.

У теперішній час опрацьовано безліч різноманітних способів визначення активності сироваткової ChE, частина котрих знайшла практичне застосування у клінічній лабораторній практиці. Найпоширенішими є спектрофотометричні та фотоколориметричні методики, котрі у свою чергу підрозділяються на прямі, в яких як субстрат біохімічної реакції використовується бензоїлхолін або його похідне, та посередні (непрямі), в котрих переважно використовується як субстрат власне ацетилхолін.

Прямий УФ-метод Kalow [1], а також його модифікації [2] полягають у безпосередньому вимірюванні витрати субстрату бензоїлхоліну (або його похідних), завдяки різниці у спектрах світлопоглинання субстрату та продуктів його ензимного гідролізу. Активність ChE визначають шляхом реєстрації зменшення світлопоглинання реакційної суміші за довжини хвилі, що відповідає максимуму поглинання субстрату ензимної реакції в УФ ділянці спектра при 235-240 нм. Однак цей спосіб характеризується вузьким концентраційним інтервалом лінійності, що обумовлено впливом компонентів плазми чи сироватки. Інші проблеми пов'язані з так званим субстратним гальмуванням, а також з помітною швидкістю реакції неензимного гідролізу субстрату за умов оптимального значення величини рН середовища для ензимної реакції. Цей метод найбільш придатний для оцінювання активності бутирилхолінестерази у плазмі крові.

Відома низка інших способів визначення активності холіноестераз у крові за непрореагованою частиною ацетилхоліну у ензимній реакції. До таких ранніх фотометричних методів визначення активності ацетилхолінестерази крові належить гідроксаматний метод (метод Хестрина) [3]. В основу способу покладена здатність гідроксиламіну взаємодіяти в лужному середовищі з ацетилхоліном після осадження білку за допомогою трихлорацетатної кислоти. В результаті реакції утворюється гідроксамова кислота, яка в кислому середовищі дає з ферум (III) хлоридом розчинний жовто-коричневий комплекс. Інтенсивність його забарвлення пропорційна концентрації ACh. Активність ензиму визначають за різницею між кількістю ACh взятого для інкубування (контрольний ACh) та ACh непрогідролізованим за час інкубування. Вимірювання оптичної густини розчину здійснюють на фотоелектроколориметрі з зеленим світлофільтром проти води (540 нм; товщина кювети 5 мм). Переваги методу Хестрина при визначенні активності ChE полягають у можливості дослідження кінетики ензимної реакції за різних умов, метод достатньо чутливий і дозволяє працювати у широкому інтервалі концентрацій субстрата, є зручним для визначення активності холінестераз різного походження за стандартних умов (певні концентрації ензиму та субстрата, стандартний час реакції за умов дотримання нульового порядку). Але сьогодні в клінічній практиці він практично не застосовується внаслідок невисокої точності, адже отримання задовільних результатів можливе лише при зміні концентрації ацетилхоліну не менше, як на 25 %, тому не дозволяє досліджувати початкову ділянку кінетичної кривої. Метод має низьку репродуктивність (відтворюваність), трудомісткий, не має неможливості використання інших субстратів, крім висококоштовного ацетилхоліну [4].

Найближчим до запропонованого способу є спосіб оцінювання активності холінестераз за залишком ацетилхоліну в ензимній реакції за допомогою системи двох спряжених реакцій: пергідролізу ацетилхоліну (реакція з надлишком гідроген пероксиду) та індукованої нею реакції перокси кислотного окиснення індикаторної речовини о-діанізідину утвореною надацетатною кислотою в середовищі фосфатного буферу при рН 7,2 [5]. Активність ензиму оцінюють за концентрацією непрогідролізованого за час інкубування з ензимом ACh, яку визначають за наперед побудованою градуальною залежністю світлопоглинання продукту окиснення індикаторної реакції від концентрації взятого ацетилхоліну після інкубування його за відсутності ензиму (контрольний ACh 0,04-0,4 мг). Вимірювання оптичної густини розчину здійснюють на фотоелектроколориметрі через 4 хв. після додавання до суміші 1 мл стандартного водно-ацетонового (1:1) розчину ацетилхоліну, 3 мл 0,1 % в ацетоні розчину о-діанізідину та 1 мл 3 % гідроген пероксиду 1 мл 0,05 моль/л тризаміщеного натрій фосфату.

Недоліком способу можна вважати використання як індикаторна о-діанізідину, який володіє канцерогенними властивостями, а тому робота з ним створює шкідливі умови праці і порушує принцип "Зеленої хімії".

Задачею корисної моделі є створення способу визначення активності холінестерази крові, який би дозволив забезпечити необхідну точність та відтворюваність результатів аналізу, а також створити безпечні умови праці при виконанні аналізу.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі визначення активності холінестерази крові, що полягає у фотометричному вимірюванні швидкості enzymного гідролізу субстрату ацетилхоліну за його залишком у середовищі буферу з використанням індикатора на ацильну групу, згідно з корисною моделлю, як індикатор на ацильну групу використовують п-фенетидин (ПФ) при pH 8,35, а швидкість enzymного гідролізу ацетилхоліну вимірюють за тангенсом кута нахилу лінійної ділянки кінетичної кривої за довжини хвилі 358 нм.

Всі параметри заявленого способу визначені дослідним шляхом.

п-Фенетидин не токсичний та водночас більш стійкіший в розчинах при зберіганні в присутності кисню повітря, ніж о-діанізидин. У якості індикатора дозволяє забезпечити безпечні умови праці та отримувати більш точні достовірні результати.

pH середовища становить 8,35 і є оптимальним для реакцій гідролізу ацетилхоліну в присутності enzymу холінестерази, пергідролізу з надлишком гідроген пероксиду, а також для індикаторної реакції, що суттєво спрощує аналіз.

Оптичну густину досліджуваних розчинів доцільно визначати у фотометричному методом за довжини хвилі 358 нм, оскільки саме за цієї довжини хвилі спостерігається максимальне поглинання продукту окиснення.

Заявлений спосіб здійснюють наступним чином.

Виготовлення розчинів: 0,5 % розчин п-фенетидин гідрохлориду виготовляють за точною наважкою об'ємно-ваговим методом у двічі дистильованій воді, який зберігають у щільно закоркованому флаконі з темного скла у прохолодному місці. Розчин ацетилхоліну хлориду вихідної концентрації $5,4 \cdot 10^{-3}$ моль/л готують шляхом розчинення 40,0 мг ацетилхоліну хлориду у 40,0 мл двічі дистильованої води. Як стандарт використовують очищений препарат enzymу холінестерази сироватки коня К.Ф. 3.1.1.8 (VI клас) з питомою активністю 28 АО/мг (за сертифікатом).

Розчин робочого стандартного зразка (РСЗ): точну наважку порошку холінестерази (80 мг) розчиняють у 20,0 мл двічі дистильованої води при помірному нагріванні.

Розчин випробуваного зразка: точну наважку порошку холінестерази (80 мг) розчиняли у 20,0 мл двічі дистильованої води при помірному нагріванні.

Термін придатності розчинів 1 доба.

Розчин гідроген пероксиду виготовляють з 50 % розчину о.с.ч. шляхом відповідного розбавлення двічі дистильованою водою. Концентрацію робочого розчину гідроген пероксиду контролюють перманганатометрично. Для виготовлення буферного розчину з pH 8,35 у мірній колбі на 1 л 28,2 г натрій фосфату двозаміщеного розчиняють у 900 мл двічі дистильованій воді і додають 20 мл 0,2 моль/л наперед виготовлено з фіксаналу стандарт-титру розчин хлоридної кислоти з подальшим доведення об'єму до 1000 мл.

Світлопоглинання вимірюють на СФ-26 (358 нм, $l=1$ см). Швидкість реакцій характеризують тангенсом кута нахилу лінійної ділянки кінетичної залежності $A-t$ (хв.). Вимірювання здійснюють при $+37^\circ\text{C}$, температуру реакційної суміші забезпечують водяним термостатуванням.

Корисна модель ілюструється прикладом.

Приклад 1. Фотометричне визначення активності холінестерази крові.

Побудова градувального графіка. У п'ять пробірок з притертим корком на 20 мл послідовно вносили 10,0 мл 0,2 моль/л фосфатного буферного розчину з pH 8,35, додають 2,50 мл, 2,25 мл, 2,00 мл, 1,75 мл, 1,50 мл двічі дистильованої води. Відповідно до номеру пробірки вносили 0,50 мл, 0,75 мл, 1,00 мл, 1,25 мл, 1,50 мл 4,0 мг/мл розчину РСЗ холінестерази та одразу перемішували їх вміст шляхом перевертанням, вмикали секундомір та термостатували при $+37^\circ\text{C}$ 10 хв. Потім до одержаної суміші додавали 1,0 мл $5,4 \cdot 10^{-3}$ М розчину ацетилхоліну і знову термостатували при $+37^\circ\text{C}$ ще 10 хв. Після цього у пробірку вносили 1,60 мл 10 % розчину гідроген пероксиду, перемішували та залишали у термостаті при $+37^\circ\text{C}$. Через 10 хв. до розчину додавали 1,0 мл 0,5 % розчину п-фенетидину. Суміш перемішували та переносили у кварцову кювету спектрофотометру на 1 см. Через кожні 2 хв. впродовж 15 хв. вимірювали світлопоглинання A при 358 нм. Досліди з кожною концентрацією enzymу повторювали тричі. За отриманими даними будували кінетичні криві у координатах $A-t$, за прямолінійними ділянками котрих розраховують тангенси кутів нахилу у хв.^{-1} . Градувальний графік будували за усередненими значеннями тангенсів кутів нахилу, які відповідали певній концентрації розчину робочого стандартного (РСЗ) enzymу. Розраховували рівняння градувальної залежності $\text{tg}\alpha$ - концентрація enzymу за методом найменших квадратів.

Лінійна залежність умовної швидкості реакції ($\text{tg}\alpha$) від концентрації ферменту спостерігається в інтервалі концентрацій 0,12-0,36 мг/мл.

На кресленні наведене рівняння градувального графіка залежності умовної швидкості індикаторної реакції від концентрації ChE.

Хід визначення. 80 мг порошку випробуваного зразка холінестерази (точна наважка) розчиняли у 20,0 мл двічі дистильованої води при помірному нагріванні. У пробірку з притертим корком на 20 мл послідовно вносили 10,0 мл 0,2 моль/л фосфатного буферного розчину з рН 8,35, 2,0 мл двічі дистильованої води, 1,00 мл випробуваного розчину холінестерази, вмикали секундомір і інтенсивно перемішували отриману суміш шляхом перевертання пробірки та термостатували при +37 °С 10 хв. Потім до одержаної суміші додавали 1,00 мл $5,4 \cdot 10^{-3}$ М розчину ацетилхоліну і знову термостатували при 37 °С ще 10 хв. Після цього вносили 1,60 мл 10 % розчину гідроген пероксиду і знову термостатували при 37 °С (10 хв.). Через 10 хв. до розчину додавали 1,0 мл 0,5 % розчину ПФ. Суміш ретельно перемішували струшуванням пробірки і одразу переносили у кварцову кювету спектрофотометру на 1 см. Через кожні 2 хв. впродовж перших 15 хв. вимірювали світлопоглинання А при 358 нм. Дослід повторюють ще чотири рази.

За отриманими даними будували кінетичні криві у координатах А-*t*, за прямолінійними ділянками котрих розраховували тангенс кутів нахилу. За усередненим п'ятьма значеннями величини тангенсу за допомогою рівняння градювального графіка обчислювали вміст ензиму у розчині. Питому активність випробуваного зразка ензиму (U) розраховували за формулою:

$$U = C \times 16,6 \times 20 \times 0,35 = 27,9 \text{ АО/мг,}$$

де С - усереднене значення вмісту ензиму в розчині, знайдене за градювальним графіком, у мг/мл; 16,6 - загальний об'єм розчину, мл; 20 - коефіцієнт розведення; 0,35 - перерахунок питомої активності ензиму у міжнародні одиниці.

Метрологічні характеристики запропонованого способу: RSD=2,0 %, правильність 0,4 %.

Таким чином, заявлено новий спосіб визначення активності холінестерази крові характеризується високою чутливістю, достовірністю і відтворюваністю результатів, а також дозволяє створити безпечні умови праці при виконанні аналізу.

Джерела інформації:

1. Kalow W., Lindsay H.A. A comparison of optical and manometric methods for the assay of human serum cholinesterase // Can J. Biochem Physiol. - 1955; 33:568-574].

2. Kalow W., Genest K. A method for the detection of atypical forms of human serum cholinesterase; determination of dibucaine number // Canad. J. Biochem. Physiol. - 1957. - V. 3, № 6. - P. 339-346.

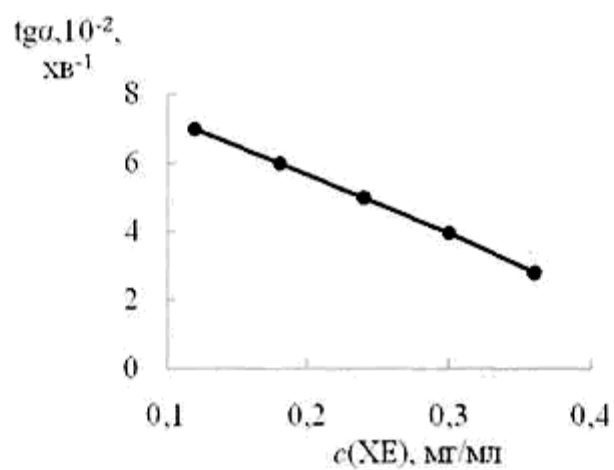
3. Hestrin S. The reaction of cetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine, and its analytical applications // J. Biol Chem. - 1949. - V. 180. - P. 249-261.

4. Яковлев В.А. Кинетика ферментативного катализа. - М.: Наука, 1965. - С. 144.

5. Hanker J.S., Gelberg A., Witten B. Colorimetric Estimation of Some Cholinergic Esters: Application to the Demonstration of Acetylcholinesterase Activity // J. Am. Pharm. Assoc. (Scientific ed.). - 1958. - Vol. 47, № 10. - P. 728-730.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб визначення активності холінестерази крові, що полягає у фотометричному вимірюванні швидкості ензимного гідролізу субстрата ацетилхоліну за його залишком у середовищі буферу з використанням індикатора на ацильну групу, який **відрізняється** тим, що як індикатор на ацильну групу використовують *p*-фенетидин при рН 8,35, а швидкість ензимного гідролізу ацетилхоліну вимірюють за тангенсом кута нахилу лінійної ділянки кінетичної кривої за довжини хвилі 358 нм.



Комп'ютерна верстка О. Гергіль

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

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