



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **75758** (13) **U**
(51) МПК (2012.01)
A61B 10/00
G01N 33/48 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2012 07030	(72) Винахідник(и): Мішалов Володимир Дем'янович (UA), Козлов Сергій Володимирович (UA), Дунаєв Олександр Віталійович (UA)
(22) Дата подання заявки: 11.06.2012	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.12.2012	(73) Власник(и): НАЦІОНАЛЬНА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ ПІСЛЯДИПЛОМНОЇ ОСВІТИ ІМЕНІ П.Л. ШУПИКА, вул. Дорогожицька, 9, м. Київ, 04112 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.12.2012, Бюл.№ 23	

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

(57) Реферат:

Спосіб оцінки рівня енергетичного метаболізму міокарда шляхом дослідження біохімічних властивостей тканини міокарда in vivo включає спектрофотометричну реєстрацію утворення відновленої форми нікотинаміддинуклеотиду в інкубаційній середовищі. Потім 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).

UA 75758 U

Корисна модель належить 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 креатиніну, креатину і саркозину 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 546 нм.

Недоліком об'єкта також є низька точність кінцевого результату, що зумовлене неможливістю вивчення біологічних тканин і органів, а також значними витратами біологічних рідин (3-5 мл).

В основі способу визначення активності дегідрогеназ пентозофосфатного шляху [3] покладене фракціонування гомогенату досліджуваного зразка (шматочка тканини масою 1-5 г) методом диференціального центрифугування у соляному буфері, який містить 0,15 М KCL і 0,02 М KHCO_3 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 3,0 мл), що містить 5 мкМ трис HCL буфер, 50 мкМ MgCl_2 , 5 мкМ субстрату (глюкозо-6-фосфат (натрієва сіль) або 6-фосфоглюконат (натрієва сіль)). В кювету спектрофотометра додають 3 мл інкубаційного середовища, 0,1 мл гомогенату і починають реакцію шляхом додавання 0,1 мл 5 мкМ розчину НАДФ. Вивчення оптичної щільності розчину в ході дегідрогенізованої реакції реєструють шляхом спектрофотометрії протягом 5 хв з інтервалом 1 хв. Розрахунок активності ферментів проводять за формулою:

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

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

Як і вищезазначене сімейство аналогів, цей спосіб теж характеризується замалою точністю, внаслідок неможливості одночасного визначення активності фермента і відповідного субстрата в одному взірці (ділянці тканини), значними витратами біологічного матеріалу, що не дозволяє проводити визначення ферментативної активності в обсязі тканини масою менше 1 г, 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 нікотинаміддинуклеотиду 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.

Поставлена задача, вирішується 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 нікотинаміддинуклеотиду в інкубаційному середовищі, у відповідності з корисною моделлю, додатково після гомогенізації зразка 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 фермента і відповідного субстрату в одному взірці (ділянці тканини), значними витратами біологічного матеріалу, що не дозволяє проводити визначення ферментативної активності в обсязі тканини масою менше 1 г, а також замалої інформативності 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*.

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 150 мг тканини міокарда біопсійного матеріалу отримують 5 % тканинний гомогенат. Із 3 мл приготованого на холоді гомогенату відбирають 1,6 мл для визначення концентрації лактату, малату, пірувату, а решту частини 1,4 мл 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 150 мг тканини міокарда біопсійного матеріалу відповідно кожного зразка отримали 5 % тканинний гомогенат. Із 3 мл приготованого на холоді гомогенату відбирали 1,6 мл для визначення концентрації лактату, малату, пірувату, а решту частини 1,4 мл 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), 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]. 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 наведено в таблиці.

Таблиця

Показники концентрації біохімічних ферментів в патологічно не змінений зоні ділянки міокарда лівого шлуночка і в зоні його ішемії ділянки у хворого

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

Таким чином, як видно із прикладу конкретного випадку, запропонований спосіб дозволяє провести кількісне співставлення інтенсивності різних метаболічних циклів по одному взірцю біопсійного матеріалу (за рахунок паралельного визначення активності ферментів циклу трикарбонових кислот, окислювального фосфорилування, трансамінування, пентозофосфатного шунта), тобто - визначити рівень енергетичного метаболізму в патологічно змінений зоні ділянки міокарда, що дозволяє підвищити точність дослідження, обмежити обсяг хірургічного втручання.

Джерела інформації:

1. А.с. 1347016 СССР. МКИ G 01 N 33/49. Способ исследования метаболизма миокарда/М.Т. Парашко (СССР).-5 с.

2. А.с. 1582993 СССР. G 01 N 33/68. Способ определения содержания креатинина, креатина и саркозина в биологических жидкостях/Л.М. Чебышев (СССР).-6 с.

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 Micrigram Quantities of Protein-Dye Binding// Analitical Biochemistry.-1976. - N 2. - P. 248-254.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

5

Спосіб оцінки рівня енергетичного метаболізму міокарда шляхом дослідження біохімічних властивостей тканини міокарда *in vivo*, що включає спектрофотометричну реєстрацію утворення відновленої форми нікотинаміддинуклеотиду в інкубаційній середовищі, який **відрізняється** тим, що після гомогенізації зразка 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), 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, пірувату і малату, і за величиною показників активності ферментів оцінюють рівень метаболізму міокарда.

10

15

Комп'ютерна верстка Л. Купенко

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