



УКРАЇНА

(19) UA (11) 22712 (13) A

(51) G 01 N 33/573

ДЕРЖАВНЕ
ПАТЕНТНЕ
ВІДОМСТВО

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

без проведення експертизи по суті
на підставі Постанови Верховної Ради України
№ 3769-XII від 23.XII. 1993 р.

Публікується
в редакції заявника

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ МОНОАМІНОКСИДАЗИ В БІОЛОГІЧНИХ СУБСТРАТАХ

1

(21) 97031318
(22) 21.03.97
(24) 07.04.98
(46) 30.06.98. Бюл. № 3
(47) 07.04.98
(72) Руль Юрій Володимирович, Аністратенко
Тетяна Іванівна, Ципріян Віктор Іванович
(73) Національний медичний університет
ім.акад.О.О.Богомольця

(57) Способ определения активности моноаминоксидазы в биологических субстратах путем исследования физико-химических параметров ферментно-субстратной смеси, о т л и ч а ю щ и й с я тем, что к раствору

2

серотонина, взятого в заведомом избытке по отношению к предполагаемой концентрации фермента, прибавляют исследуемую биологическую жидкость или гомогенат ткани, содержащих фермент моноаминоксидазу, пропускают через нее слабый высокочастотный ток и по скорости изменения напряжения в цепи судят о скорости ферментативного процесса, регистрируемой в любой момент или общей скорости по всей аналоговой кривой ферментативного процесса от его начала до окончания, а по величине сдвига напряжения за весь период реакции судят о концентрации фермента в исследуемом субстрате.

Изобретение относится к медико-биологическим отраслям знаний и практической деятельности (медицине, ветеринарии, биологии, токсикологии и гигиене).

Известен способ, при помощи которого активность моноаминоксидазы определяют по количеству аммиака, образовавшегося в результате ферментативной реакции между моноаминоксидазой и ее биологическим субстратом – серотином, путем применения фенолгипохлорида в качестве индикатора аммиака после изотермической отгонки. Белок при этом определяют по методу Лоури [Горошинская И.А. Активность моноаминоксидазы в мозгу и печени при разных режимах гипероксии. Автореферат диссертации канд.биол.наук. Минск, 1977].

Однако этот способ основан на определении высоколетучего соединения – аммиака, который, кроме того, обладает способностью проникать во многие материалы, из которых изготовлена химическая посуда и оборудование для изотермической отгонки, временно задерживаться в них, а затем медленно мигрировать из них в окружающий воздух. В результате этого создаются нестандартные условия определения моноаминоксидазы, что существенно снижает ценность данного способа.

Известен также способ определения моноаминоксидазы в сыворотке крови флуориметрическим методом [Ильичева Р.Ф., Горкин В.З. Определение моноаминоксидазы в сыворотке крови человека. Лаборатор-

(19) UA (11) 22712 (13) A

ное дело, 1979, № 9, с. 534–536], при помощи которого активность моноаминоксидазы определяют по убыли серотонина в пробах, остаток которого (недезаминированный моноаминоксидазой) конденсируют с нингидрином с образованием флуоресцирующего соединения. Количество серотонина при этом определяют флуориметрическим методом [Юденфренд С. Флуоресцентный анализ в биологии и медицине, пер. с англ. М., "Мир", 1965, с. 109–113] модифицированным [Кулинский В.И. и Костюковская Л.С. Определение серотонина в цельной крови человека и лабораторных животных. – Лабораторное дело, 1969, № 7, с. 390–394].

Указанный способ имеет ряд недостатков:

многоэтапность способа (определение состоит из 29 этапов, если не считать обязательную многоэтапную подготовку очень чистых реактивов, используемых для определения), что связано с дозированием большого числа реактивов;

при использовании способа прототипа применена экстракция серотонина из биосубстрата бутанольным экстрагентом с последующим разделением фаз, имеют место потери серотонина как за счет несовершенства разделения фаз, так и за счет неполной экстракции амина (соотношение градиентов концентраций не равно 100%);

большая продолжительность выполнения способа (5,5–6 часов на одно определение, если не считать затрат времени на подготовку высокочистых реактивов);

способ недостаточно информативен, так как позволяет получить лишь один показатель – количество остатка серотонина в пробе всегда через один и тот же промежуток времени (10 мин) от начала ферментативной реакции, что дает возможность судить не столько об активности моноаминоксидазы (в правильном ее понимании), сколько о количестве дезаминированного ферментом серотонина, определяемом в момент, отдаленный от начала реакции на 10 мин. При этом, так называемая активность моноаминоксидазы рассчитывается авторами прототипа исходя из допущения, что реакция во всех случаях прекращается через 10 минут (не более и не меньше) от ее начала. То есть, способ-прототип не позволяет объективно оценить активность моноаминоксидазы в тех случаях, когда реакция длится менее или более 10 минут;

способ недостаточно информативен, так как не позволяет документировать результаты определения активности моноаминоксидазы и визуально следить за ходом ферментативного процесса в любой его мо-

мент; способ недостаточно информативен, так как использует лишь один показатель, основанный на количестве дезаминированного серотонина, определяемого косвенным путем (по количеству непрореагировавшего серотонина);

способ недостаточно информативен, так как в нем не оговаривается, что серотонин должен вводиться в пробу (в инкубационную смесь) в заведомо избыточных количествах (по отношению к максимально высокой предполагаемой способности моноаминоксидазы к дезаминированию данного субстрата), в связи с чем может возникнуть ситуация, при которой весь серотонин, введенный в инкубационную смесь будет подвергнут дезаминированию, а "ресурс" моноаминоксидазы до конца не будет реализован. В этом случае истинная активность моноаминоксидазы не может быть установлена;

необходимость использования относительно большого количества дефицитного субстрата (серотонина), отнесенного к медикаментам группы А (ограниченной выдачи, учета и хранения) по 1 мкг на пробу;

необходимость использования относительно большого количества биологического субстрата (например крови – по 1 мл на пробу), что практически исключает постановку параллельных проб, особенно при изучении активности монооксидазы в биологических жидкостях мелких лабораторных животных, в микропробах (биоптатах) тканей и органов, имеющих небольшую массу, а также в тех случаях, когда требуется изучить взаимосвязь активности моноаминоксидазы с уровнями ряда других тестов в том же биологическом субстрате, отобранной от одной и той же особи мелкого лабораторного животного.

Задачей изобретения является упрощение способа, сокращение продолжительности и повышение информативности определения активности моноаминоксидазы в биологических субстратах.

Указанная задача достигается тем, что к раствору серотонина, взятого в заведомом избытке по отношению к предполагаемой концентрации фермента, прибавляют исследуемую биологическую жидкость или гомогенат ткани, содержащую фермент моноаминоксидазу, пропускают через инкубационную смесь слабый высокочастотный ток, частота и сила которого постоянны, не вызывают перегрева смеси и образования ионного тока в ней, и по скорости изменения напряжения в цепи судят о скорости ферментативного процесса, регистрируемой в любой момент (активности фермента)

или общей скорости (общей активности) по всей аналоговой кривой ферментативного процесса от его начала до окончания, а по величине сдвига напряжения за весь период реакции судят о концентрации фермента в исследуемом биологическом субстрате. При этом также учитывают продолжительность реакции "моноаминоксидаза-серотонин", максимальную активность (в момент наиболее высокой скорости изменения напряжения в цепи) и показатель отношения максимальной активности фермента к общей активности.

Способ осуществляют следующим образом.

Раствор серотонина, концентрация которого позволяет создать в инкубационной смеси заведомый избыток серотонина по отношению к предполагаемой концентрации фермента моноаминоксидазы в пробе, термостатируют при температуре $+37^{\circ}\text{C}$, в него вносят биологическую жидкость, гомогенат ткани, органа или биоптата и через полученную инкубационную смесь пропускают слабый высокочастотный ток постоянной частоты и силы, не вызывающих перегрев реакционной смеси и ионного тока в ней, и по скорости изменения сопротивления в ней, определяемой по скорости изменения напряжения в цепи, определяют активность моноаминоксидазы в любой момент реакции или (и) общую активность фермента по данным динамики изменения напряжения в ходе всей ферментативной реакции. Кроме того, на основании этой динамики рассчитывают показатели продолжительности реакции, максимальной активности фермента и отношение максимальной активности к общей. Продолжительность ферментативной реакции выражается в часах и долях часа от момента смешивания биологического субстрата и раствора (серотонина) до момента прекращения изменения напряжения в цепи. Концентрацию моноаминоксидазы в биологическом субстрате выражают в милливольт-ах на литр цельной биологической жидкости, содержащей фермент, или на кг сырой ткани (или органа) или в молях (миллимолях, микромолях) субстрата (серотонина) на литр (кг) биологического материала, взятого для испытания. В случае выражения концентрации моноаминоксидазы в молях серотонина, дезаминированного данным ферментом, на л (кг) биологического материала максимальный сдвиг напряжения в цепи в милливольт-ах умножают на коэффициент, соответствующий цене 1 мВ в микромолях/л (кг). Общую активность моноаминоксидазы выражают в милливольт-ах (молях серотонина) на 1 л (кг) биоматериала за 1 час, что

соответствует частотному от деления концентрации моноаминоксидазы (в мВ (микромолях) серотонина) на л (кг) продолжительность ферментативной реакции в часах. Максимальную активность моноаминоксидазы выражают в милливольт-ах (микромолях серотонина) на л (кг) биоматериала за час на наиболее крутом отрезке диаграммной аналоговой кривой, то есть в момент наиболее высокой скорости изменения напряжения в цепи. Отношение максимальной активности моноаминоксидазы к общей активности данного фермента выражают в безразмерных единицах, соответствующих частотному от деления величины максимальной активности фермента (в мВ/мкмоль серотонина) на л (кг) биоматериала на величину общей активности моноаминоксидазы (также в мВ (мкмоль серотонина) на л (кг) биоматериала. Вышеуказанные показатели позволяют оценить "ресурс" биологической жидкости (ткани) по дезаминированию серотонина, скорость этого дезаминирования на этапе ее максимального развития, что характеризует максимальные возможности моноаминоксидазы по скорости дезаминирования серотонина, в течение более продолжительного срока и соотношение этих процессов, характеризующее изменчивость темпов обработки серотонина моноаминоксидазой во времени. Эти показатели имеют огромное значение для оценки процессов синтеза моноаминоксидазы и проявления ею своих специфических свойств;

П р и м е р 1. Исследование проводили на анализаторе ферментативной активности отечественного производства типа АФ-1.

В кювету анализатора вносили 2 мл раствора серотонина в концентрации 0,25 мкг в 1 мл Трис буфера ионной силой 0,1 н. Кювету помещали в гнездо термостата ($+37^{\circ}\text{C}$) и вставляли в нее электроды и подключали их к клеммам прибора. После доведения температуры раствора до $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ производили пробную запись величины напряжения в цепи при стабильных параметрах частоты (880 кГц) и силы тока (20 мкА). Убедившись в стабильности исходного уровня напряжения в цепи (12,5 мВ) и, следовательно, в постоянстве сопротивления раствора слабому высокочастотному току, через отверстие в крышке электрода в кювету вводили 0,01 мл исследуемой сыворотки крови, перемешивали 20 сек электромагнитной мешалкой вибратором образовавшуюся инкубационную смесь, а затем регистрировали при помощи самопишущегося милливольтметра Н-39 на диаграммной ленте кривую изменения напряжения в цепи, то есть кривую хода ферментативного процесса. Скорость движения

диаграммной ленты была равна 180 мм/час. Ферментативная реакция "моноаминоксидаза сыворотки крови - серотонин" от ее начала до окончания зафиксирована на участке ленты длиной в 27 мм, что соответствует продолжительности реакции 27 мм/180 мм/ч = 0,15 часа. Отклонение стрелки милливольтметра к концу реакции достигло 32 мм, что при масштабе шкалы 100 мм:25 мВ соответствует 5,5 мВ. Как установлено при калибровке, 1 мВ при данных условиях соответствует дезаминированию 0,182 мкмоль серотонина в расчете на 1 л сыворотки (учитывая введение в пробу 0,01 мл сыворотки). Следовательно, в данном примере концентрация фермента моноаминоксидазы в сыворотке крови равна $5,5 \text{ мВ} \cdot 0,182 \text{ мкмоль/л} = 1,001 \text{ мкмоль/л}$. Поскольку 1,001 мкмоль серотонина дезаминировано моноаминоксидазой, содержащейся в 1 л испытуемой сыворотки крови за 0,15 часа, то есть общая активность фермента (в мкмоль/л · час) составит $1,001/0,15 = 6,6733 \text{ мкмоль/ч} \cdot \text{л}$. Наиболее высокая активность фермента в данном примере зарегистрирована на отрезке кривой, отклоненной от нулевой линии на $63,5^\circ$, что соответствует отклонению стрелки милливольтметра на данном участке кривой на 1,549 мм на шаг движения диаграммной ленты на 1 мм. То есть, за каждые (1-180) 0,00555 часа в этот период реакции происходят дезаминирование (1,549 мм, что при масштабе шкалы 100 мм/25 мВ соответствует 0,387 мВ, что при коэффициенте 1 мВ = 0,182 мкмоль/л составляет 0,0705 мкмоль/л (0,0705 мкмоль серотонина в расчете на 1 л испытуемой сыворотки крови). При пересчете на активность моноаминоксидазы в мкмоль/ч · л максимальная активность фермента по данному примеру составит $0,0705/0,0055$, что составит 12,703 мкмоль/ч · л. Исходя из этого, отношение максимальной активности моноаминоксидазы к общей равно $12,703/6,6733 = 1,9$.

Таким образом, входными характеристиками для расчетов показателей активности моноаминоксидазы по данному примеру являлись: скорость движения диаграммной ленты самописца, длина участка диаграммы, занятого аналоговой кривой, отклонение стрелки самописца, угол максимального наклона кривой по отношению к нулевой линии, масштаб шкалы самопишущего милливольтметра, коэффициент перехода от милливольт к микромолям серотонина на литр (в данном случае сыворотки). Выходными параметрами характеризующими всесторонне активность моноаминоксидазы биологического матери-

ала, являются: продолжительность реакции, концентрация фермента, общая активность фермента, максимальная активность фермента, отношение максимальной активности к общей.

Пример 2 По способу, описанному в примере 1 (без каких-либо изменений) на том же анализаторе ферментативной активности типа АФ-1 произведено исследование 10 проб сыворотки крови, отобранных от интактных крыс-самок беспородных альбиносов. Результаты представлены в табл.1. Расчет показателей активности моноаминоксидазы произведен также как и в примере 1 с учетом переходного коэффициента (от мВ к мкмоль/л равного 0,182).

Как видно из цифровых данных, приведенных в табл. 1, средняя продолжительность реакции составила $0,12 \pm 0,01$ часов, средняя (по 10 определениям) концентрация моноаминоксидазы сыворотки крови интактных крыс-самок равна $0,69 \pm 0,07$ мкмоль серотонина/л, средняя общая активность моноаминоксидазы по данной группе составляет $5,95 \pm 0,34$ мкмоль серотонина/ч · л, средняя максимальная активность моноаминоксидазы сыворотки крови составляет $13,80 \pm 1,46$ мкмоль/ч · л, отношение максимальной активности к общей составляет в среднем $2,31 \pm 0,19$.

Таким образом, полученные в данном примере цифровые результаты позволяют наиболее полно оценить особенности активности моноаминоксидазы как у каждого животного отдельно, так и по однородным группам лабораторных объектов.

Пример 3. С целью определения активности моноаминоксидазы в пробах тканей и органов проведены исследования проб легочной ткани и сердечной мышцы. Для определения использовали тот же прибор АФ-1, что и при исполнении примеров 1 и 2. Навеску ткани массой 500 мг вносили в форфоровую ступку, растирали пестиком, добавляли постепенно 3 мл 5,2% изотонического раствора глюкозы в дистиллированной воде, затем количественно переносили в центрифужную пробирку добавляя еще 1,5 мл раствора (до 5 мл). Таким образом получали гомогенат с разбавлением 1:10. После центрифугирования использовали супернатант в количестве 0,01 мл по методике, описанной в примерах 1 и 2 (условия центрифугирования: 5000 об/мин в течение 10 минут). Результаты определения моноаминоксидазы в пробах легочной ткани и сердечной мышцы представлены в табл.2. Учитывая разбавление гомогенатов в 10 раз, коэффициент перехода мВ в мкмоль/кг тка-

ни принят 1,82/вместо 0,182 при непосредственном использовании биологической жидкости без ее предварительного разбавления, как это было принято в примерах 1 и 2 по отношению к сыворотке крови.

Как видно из данных, приведенных в табл.2, способ позволяет отделить активность моноаминоксидазы не только в биологических жидкостях но и в пробах тканей и органов в связи с чем становится правомерным название способа: "Способ определения активности моноаминоксидазы в биологических субстратах".

Таким образом, предлагаемый способ имеет по сравнению со способом-прототипом следующие преимущества:

предлагаемый способ выполняется практически в 3 этапа (в отличие от 29 этапов по способу прототипа);

продолжительность реакции по предлагаемому способу колеблется, как видно из примеров, в пределах $0,067 \pm 0,21$ часа, а все определение выполняется за 20 мин (в то время как по способу-прототипу в течение $5,5 \pm 6,0$ часов);

способ обладает высокой информативностью, так как в прямом (а не косвенном, как по способу-прототипу) позволяет оце-

нить и задокументировать все особенности кинетики ферментативного процесса при помощи показателей продолжительности реакции, концентрации моноаминоксидазы, общей и максимальной активности моноаминоксидазы, отношения максимальной активности фермента к общей;

предлагаемый способ позволяет избежать искажения результатов определения в связи с избыточной активностью моноаминоксидазы по отношению к количеству серотонина, находящемуся в пробе; способ-прототип не гарантирован от этого;

предлагаемый способ требует для своей реализации значительно меньших количеств серотонина (в 20 раз) и биологического материала (сыворотки крови в 20 раз, ткани в 200 раз) чем способ прототип; при необходимости количества этих ингредиентов могут быть уменьшены еще в 10–20 раз,

практически без ущерба для основных характеристик способа – при реализации предлагаемого способа не возникает необходимость в применении экстрактов и экстрагентов и последующем разделении фаз, в связи с чем отсутствуют потери аминов, неизбежные при применении способа-прототипа.

Т а б л и ц а 1

Результаты определения показателей активности моноаминоксидазы сыворотки крови у intactных самок крыс

№	Входные параметры реакции				Выходные параметры (показатели)			
	Максимальное отклонение кривой, мм	Путь диаграммной ленты за время реакции, мм	Максимальный угол отклонения кривой, град	Продолжительность реакции, ч	Концентрация фермента, мкм/л	Общая активность фермента, мкм/ч·л	Максимальная активность, мкм/ч·л	Отношение максимальной активности к общей
1	11	20	54	0,110	0,51	4,50	9,28	2,06
2	11	18	51	0,100	0,51	5,0	8,45	1,69
3	10	13	50	0,072	0,46	6,3	8,19	1,30
4	12	12	70	0,067	0,55	8,19	16,07	1,96
5	17	20	78	0,110	0,77	6,96	22,70	3,26
6	20	28	69	0,160	0,91	5,85	15,46	2,64
7	10	16	60	0,08	0,45	5,12	11,28	2,2
8	19	29	65	0,160	0,86	5,36	13,36	2,50
9	18	23	70	0,130	0,82	6,40	16,10	2,52
10	25	35	72	0,190	1,10	5,85	17,40	2,97
Статистические параметры				X	0,69	5,95	13,80	2,31
				±	0,07	0,34	1,46	0,19
				±	0,23	1,08	4,6	0,58
				33,333	33,33	18,15	33,33	25,11

Т а б л и ц а 2

Результаты определения активности моноаминоксидазы в пробах супернатантов, полученных из разбавленных гомогенатов тканей

№	Входные параметры реакции				Выходные параметры (показатели)			
	Максимальное отклонение кривой, мм	Путь диаграммной ленты за время реакции, мм	Максимальный угол отклонения кривой, град	Продолжительность реакции, ч	Концентрация фермента, мкм/кг	Общая активность фермента, мкм/ч·кг	Максимальная активность, мкм/ч·кг	Отношение максимальной активности к общей
1	Легкие 20	31	65	0,17	9,10	52,80	133,6	2,50
2		18	67	0,1	8,2	81,90	143,6	1,75
Статистические параметры			X	0,14	8,65	67,35	138,6	2,13
			±	0,03	0,45	14,55	5,0	0,37
			±	35,70	7,40	30,60	5,14	24,90
1	Сердце 20	37	55	0,21	9,10	44,20	95,8	2,17
2		20	68	0,11	5,90	53,00	149,0	2,79
Статистические параметры			X	0,16	7,55	48,60	122,4	2,48
			±	0,05	1,65	4,40	26,6	0,31
			±	0,07	2,33	6,22	37,6	0,44
				43,80	30,45	12,80	30,70	17,75

13

22712

14

22712

Упорядник

Техред М.Келемеш

Коректор М. Керецман

Замовлення 4501

Тираж

Підписне

Державне патентне відомство України,
254655, ГСП, Київ-53, Львівська пл., 8

Відкрите акціонерне товариство "Патент", м. Ужгород, вул.Гагаріна, 101