



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **75612** (13) **U**  
(51) МПК (2012.01)  
**A99Z 99/00**  
**G01N 33/00**

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**

<b>(21)</b> Номер заявки: <b>u 2012 05564</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и): <b>Шляховенко Володимир Олексійович (UA),</b> <b>Орловський Олексій Аркадійович (UA)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки: <b>07.05.2012</b>	
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>10.12.2012</b>	<b>(73)</b> Власник(и): <b>ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ПАТОЛОГІЇ, ОНКОЛОГІЇ І РАДІОБІОЛОГІЇ ІМ. Р.Є. КАВЕЦЬКОГО НАН УКРАЇНИ,</b> <b>вул. Васильківська, 45, м. Київ, 03022 (UA)</b>
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту: <b>10.12.2012, Бюл.№ 23</b>	

**(54) КОНДУКТОМЕТРИЧНИЙ СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ОРНІТИНДЕКАРБОКСИЛАЗИ В БІОЛОГІЧНИХ МАТЕРІАЛАХ**

**(57) Реферат:**

Кондуктометричний спосіб визначення активності орнітиндекарбоксилази в біологічних матеріалах, при якому активність орнітиндекарбоксилази вимірюють за зменшенням електричної провідності біологічного матеріалу.

**UA 75612 U**



Корисна модель належить до медицини та біології, зокрема біохімії.

Орнітиндекарбоксилаза (ОДК; ЕС 14.1.1.17) - ключовий фермент біосинтезу поліамінів, які є обов'язковими регуляторами основних функцій клітини, таких як проліферація (розмноження), диференціація та спеціалізація, виживання та програмована клітинна смерть (апоптоз та інші її різновиди). Специфічним субстратом ОДК є амінокислота L-орнітин, яка при взаємодії з ОДК піддається декарбоксилюванню і тим самим перетворюється на найпростіший поліамін - путресцин. Вищі поліаміни - спермідин та спермін - синтезуються вже з путресцину за допомогою інших ферментів. Дослідженню метаболізму поліамінів - в тому числі, природно, і активності ОДК - присвячені тисячі дослідницьких робіт в усьому світі. Зокрема, в онкології ОДК розглядається як одна з найперспективніших мішеней протипухлинної терапії.

Відомі три способи визначення активності (ОДК).

1. Найбільш поширений з них заснований на тому, що до біологічного матеріалу (наприклад гомогенату тканини) вносять L-орнітин (специфічний субстрат ОДК), мічений  $^{14}\text{C}$ , і активність ОДК визначають за кількістю  $^{14}\text{CO}_2$ , що виділяється при декарбоксилюванні  $^{14}\text{C}$ -L-орнітину [1]. Перевагами цього методу є його висока чутливість та специфічність, що дає змогу виявити навіть слідову активність ОДК. Недоліками його є: а) те, що, згідно з правилами техніки безпеки, цей спосіб, як і будь-який інший метод із застосуванням радіоізоотопів, може бути реалізований лише в тих установах, що мають спеціальний сертифікований СЕС та Держстандартом блок приміщень, призначених для роботи з радіоізоотопами, та спеціальний персонал, який пройшов курс навчання та склав залік з роботи з радіоізоотопами; б) необхідність високовартісного імпортного спецобладнання сцинтиляційного лічильника радіоактивності, радіоізоотопних боксів та ін.; в) необхідність високовартісного імпортного реактиву -  $^{14}\text{C}$ -L-орнітину.

2. Спектрофотометричний спосіб [2] визначення активності ОДК за підвищенням вмісту її продукту - путресцину - в біологічному матеріалі після його інкубації зі звичайним (нерадіоактивним) L-орнітином. В цьому способі вміст путресцину в біологічному матеріалі визначають за забарвленням, що утворюється при взаємодії путресцину з 2,4-динітро-1-фторбензолом. Принциповим недоліком цього способу є його низька специфічність, яка є наслідком того, що 2,4-динітро-1-фторбензол може давати однакове забарвлення при взаємодії не лише з путресцином, але й з багатьма іншими молекулами - носіями аміногруп, які частково екстрагуються разом із путресцином.

3. Хроматографічний спосіб [3] визначення активності ОДК за підвищенням вмісту її продукту - путресцину - в біологічному матеріалі після його інкубації зі звичайним (нерадіоактивним) L-орнітином. В цьому способі вміст путресцину в біологічному матеріалі визначають двічі (перед внесенням L-орнітину та після інкубації з L-орнітином) за допомогою або тонкошарової хроматографії з подальшим вимірюванням на спектрофлуориметрі, або рідинного хроматографа високого тиску (РХВТ) з флуориметричним детектором. Чутливість цього способу хоча й нижча, ніж у способу з  $^{14}\text{C}$ -L-орнітином, але досить висока. Недоліками ж його є: а) висока працемісткість та тривалість у часі, головним чином за рахунок складної та тривалої підготовки проб для хроматографії; б) необхідність високовартісного імпортного обладнання (спектрофлуориметра або РХВТ), а також високовартісного імпортного флуорофору (наприклад дансилхлориду) для мічення путресцину і органічних розчинників (метанолу, ацетонітрилу, хлороформу) хроматографічної чистоти, що також є досить дорогими, зазвичай імпортними і до того ж потребують спеціальних заходів безпеки праці; в) необхідність досвідченого персоналу для виконання пробопідготовки та роботи на спектрофлуориметрі або РХВТ.

В основу корисної моделі поставлено задачу: розробити спосіб визначення активності ОДК, який був би високоспецифічним та придатним для вимірювання активності ОДК в інтервалі її реальних фізіологічних значень, швидким, потребував максимально простого обладнання, мінімуму реактивів, мінімуму спеціального досвіду в персоналу, тобто міг би бути реалізований у будь-якій науково-дослідній або клінічній лабораторії.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі, який заявляється, активність ОДК визначають за зменшенням електричної провідності дослідної аліквоти біологічного матеріалу в процесі її інкубації зі специфічним субстратом ОДК - L-орнітином, а специфічність реакції перевіряють шляхом інкубації контрольної аліквоти того ж біологічного матеріалу спочатку з надлишковою кількістю специфічного й необоротного інгібітору ОДК - диформетилорнітину - і лише після цього - з L-орнітином.

Для виконання цього способу єдиним принципово необхідним обладнанням є будь-який кондуктометр (бажано змінного струму, але припустимо й постійного), а необхідними реактивами - L-орнітин та диформетилорнітин кваліфікації не нижче "Ч", причому для диформетилорнітину припустимо застосування рацемічної форми. Необхідна кваліфікація

персоналу зводиться до вміння готувати розчини попередньо визначеної концентрації та працювати з кондуктометром, тобто до вмінь, якими володіє кожен фахівець хімічного та медико-біологічного профілю.

Причинно-наслідковий зв'язок між сукупністю ознак способу, що заявляється, та технічним результатом корисної моделі такий.

В дослідній аліквоті біологічного матеріалу, молекула L-орнітину при взаємодії з ОДК перетворюється на путресцин, а путресцин, який є дикатионом (несе дві позитивно заряджені аміногрупи), дуже швидко - впродовж часток секунди - зв'язується з аніонними групами макромолекул (білків та нуклеїнових кислот), присутніх у досліджуваному біологічному матеріалі, завдяки чому як позитивний електричний заряд самого путресцину, так і негативний заряд взаємодіючих з ним макромолекул нейтралізується і, відповідно, зменшується провідність досліджуваного біологічного матеріалу.

В контрольній аліквоті біологічного матеріалу активний центр ОДК необоротно блокується дифторметилорнітином, завдяки чому перетворення орнітину на путресцин не відбувається, так що електрична провідність матеріалу лишається незмінною.

Приклад практичного застосування корисної моделі

ОДК-реакцію проводили в гомогенаті печінки миші, одержаному шляхом гомогенізації печінки в розчині сахарози (замість сахарози може бути використана будь-яка речовина, що має достатньо низьку константу електролітичної дисоціації та не інгібує ОДК) в гомогенізаторі Поттера. Перед постановкою реакції гомогенат частково освітлювали шляхом центрифугування. Надосадову рідину ділили на дослідну та контрольну аліквоти рівного об'єму, які використовували для подальших вимірювань. Електропровідність гомогенату вимірювали за допомогою кондуктометра змінного струму ОК-102/1 ("Radelkis", Угорщина).

Кінетичну криву реакції в дослідній аліквоті наведено на кресленні, де по осі абсцис відкладено час реакції в хвилинах, а по осі ординат - електропровідність гомогенату в мікросіменсах на квадратний сантиметр ( $\text{mS}/\text{cm}^2$ ). На графіку стрілками вказані моменти першого та другого внесення розчину субстрату ОДК - L-орнітину. В першому випадку було внесено апріорно надлишкову кількість субстрату, в другому - недостатню для розвитку максимальної швидкості реакції (креслення). На графіку видно, що при внесенні L-орнітину електропровідність гомогенату стрибкоподібно зростає, після чого поступово знижується, причому швидкість зниження електропровідності зменшується з часом, тобто з вичерпанням субстрату реакції. При повторному внесенні розчину L-орнітину реакція запускається знову, причому менша її початкова швидкість відповідає меншій кількості внесеного субстрату, що свідчить про те, що зменшення швидкості реакції з часом обумовлене саме вичерпанням субстрату, а не ушкодженням ферменту.

В контрольну аліквоту попередньо вносили розчин інгібітора ОДК - дифторметилорнітину, одержану суміш інкубували протягом 10 хвилин для зв'язування ОДК з інгібітором, після чого вносили таку ж кількість розчину L-орнітину, як при першому внесенні в дослідну пробу. Кінетичну криву цієї реакції не наводимо, оскільки реакція була цілком відсутня (електропровідність гомогенату, після стрибкоподібних підйомів при внесенні дифторметилорнітину та L-орнітину, лишалася незмінною впродовж 20 хвилин).

Таким чином, технічного результату корисної моделі досягнуто, а саме:

1) класичним методом біохімії (запускання реакції специфічним субстратом та її гальмування до нульової швидкості специфічним інгібітором) доведено повну специфічність реакції;

2) продемонстровано здатність кондуктометра реєструвати ОДК-реакцію на великому інтервалі її швидкостей, який практично відповідає всьому фізіологічному діапазону можливих величин активності ОДК;

3) доведено, що кондуктометричне вимірювання активності ОДК є багаторазово швидшим за будь-який з інших методів вимірювання активності цього ферменту, оскільки для вимірювання є цілком достатнім інтервал у 5 хвилин після внесення субстрату;

4) доведено можливість вимірювання ОДК-активності простими засобами, що доступні будь-якій науково-дослідній або клінічній лабораторії.

Джерела інформації:

1. Russell D., Snyder S. Amine synthesis in rapidly growing tissues: ornithine decarboxylase activity in regenerating liver of chick embryo and various tumors //Proc.NatlAcad. Sci. USA.-1968. - Vol. 6, N 1.-P. 1420-1424.

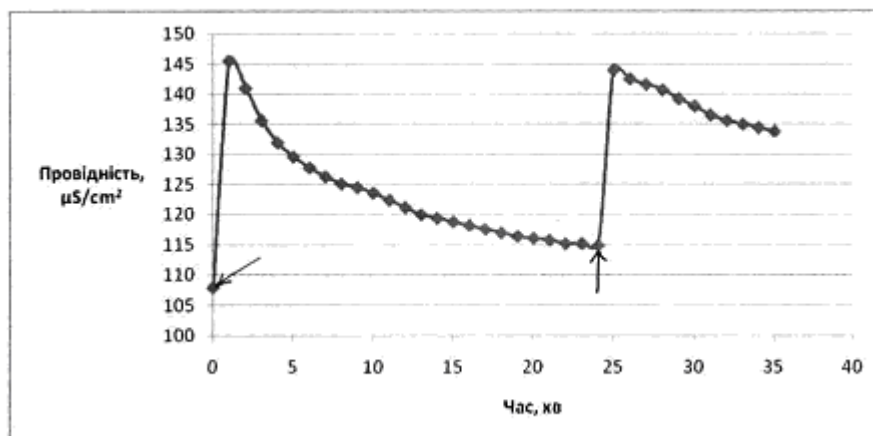
2. Сяткин С.П., Березов Т.Т. Активность орнитиндекарбоксилазы в злокачественных опухолях // Вопр. мед. химии.-1980. - Т. 26, № 1. - С. 121-124.

3. Залеток С.П. Полиаміни - маркери злоякісного росту і мішені для протипухлинної терапії. - Дис. ... докт. біол. наук. - Київ, 2007.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

5

Кондуктометричний спосіб визначення активності орнітиндекарбоксилази в біологічних матеріалах, який **відрізняється** тим, що активність орнітиндекарбоксилази вимірюють за зменшенням електричної провідності біологічного матеріалу.




---

Комп'ютерна верстка Л.Литвиненко

---

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