



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **118783** (13) **U**
(51) МПК**C12N 15/02** (2006.01)**G01N 33/50** (2006.01)МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**

(21) Номер заявки: u 2017 02283	(72) Винахідник(и):
(22) Дата подання заявки: 13.03.2017	(73) Власник(и):
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 28.08.2017	Кіндрат Ірина Петрівна, вул. Коцюбинського, 8, с. Підлужжя, Тисменицький р-н, 77442 (UA), Шпильова Світлана Іванівна, вул. Михайла Ломоносова, 21/14, м. Київ, 03127 (UA), Ерстенюк Ганна Михайлівна, вул. Галицька, 120/22, м. Івано-Франківськ, 76008 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 28.08.2017, Бюл.№ 16	

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ЗАГАЛЬНОГО ЗАЛІЗА ЗА ДОПОМОГОЮ ФЕРОЗИН-КОЛОРИМЕТРИЧНОГО АНАЛІЗУ У ПЕЧІНЦІ ЩУРІВ**(57)** Реферат:

Спосіб визначення внутрішньоклітинного заліза за допомогою ферозин-колориметричного аналізу включає приготування інкубаційних сумішей з додаванням лізату клітин до інкубаційних сумішей, вивільняють залізо з білків за допомогою соляної кислоти та залізовивільняючого реагенту, інкубацією при 60 °С, зупинкою реакції охолодженням, додаванням реагенту для визначення заліза, інкубація 30 хв., приготування стандартів для побудови стандартної кривої в межах 0-20 нмоль, та визначають абсорбцію Fe^{2+} -ферозин комплексу з максимумом поглинання $\lambda=550$ нм. Додатково використовують покращену методику ферозин-колориметричного аналізу для вивільнення заліза з тканин печінки, використовують тканину печінки щурів, готують гомогенати тканини з додаванням відповідної концентрації натрію гідрохлориду та залишають на шейкері при 25 °С через ніч. Стандартну криву будують в межах 0-60 нмоль.

UA 118783 U

Корисна модель належить до медико-біологічних досліджень, зокрема методу біохімічного визначення вмісту заліза, і може бути використана для діагностики патологічних станів, пов'язаних з порушенням обміну заліза.

Залізо - незамінний неорганічний елемент для всіх живих організмів. Залізо входить до складу гемоглобіну, міоглобіну, системи цитохромів, залізо-сірковмісних білків, каталази. Також залізо приймає участь у обміні білків, жирів і вуглеводів, відіграє важливу роль в окислювально-відновлювальних реакціях (Loréal O., Cavey T., Bardou-Jacquet E., Guggenbuhl P., Ropert M., Brissot P., 2014; Tirnitz-Parker J.E., Glanfield A., Olynyk J.K., Ramm G.A., 2013). Вміст заліза змінюється при низці патологічних станів, особливо при розвитку анемії, лейкозів, пухлинних процесів, гострих і хронічних запалень, а також за дії токсичних речовин. Печінка є центральним регулятором гомеостазу заліза в організмі. Збільшення заліза в клітинах печінки призводить до активації перекисного окислення ліпідів і утворення вільних радикалів. Активні форми кисню викликають пошкодження ДНК і деградацію інших біомолекул, а також призводять до розвитку хронічних захворювань печінки, зокрема фіброзу та цирозу, який може призводити до розвитку та прогресування раку печінки. (Sorrentino P, D'Angelo S, Ferbo U, Micheli P, Bracigliano A, Vecchione R., 2009; Anderson E.R. Shah Y.M., 2013). Найбільш близьким та вибраним за прототип є метод визначення внутрішньоклітинного заліза за допомогою ферозин-колориметричного аналізу в астороцитах, який включає приготування інкубаційних сумішей, з додаванням лізату клітин до інкубаційних сумішей, вивільнення заліза з білків за допомогою соляної кислоти та залізовивільняючого реагенту, інкубацією при 60°C, зупинкою реакції охолодженням, додаванням реагенту для визначення заліза, інкубацією 30 хв., приготуванням стандартів для побудови стандартної кривої в межах 0-20 нмоль, та визначенням абсорбції Fe²⁺-ферозин комплексу з максимумом поглинання $\lambda=550$ нм [J. Riemer, H. Hoerken, H. Czerwinska, S.R. Robinson, R. Dringen, Colorimetric ferrozine-based assay for the quantitation of iron in cultured cells. Anal Biochem. 2004. 331(2):370-5].

Недоліком цього способу є те, що він не дозволяє визначити вміст загального заліза у тканині печінки ссавців.

В основу корисної моделі поставлена задача удосконалити спосіб визначення концентрації внутрішньоклітинного заліза за допомогою ферозин-колориметричного аналізу, у якому за рахунок експериментального підбору відповідної концентрації реактивів і маси тканини, та умов перебігу експерименту, досягається отримання інформації про концентрацію загального заліза у тканині печінки тварин, а отже, і істотне розширення діагностичних можливостей способу.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб визначення внутрішньоклітинного заліза за допомогою ферозин-колориметричного аналізу включає приготування інкубаційних сумішей з додаванням лізату клітин до інкубаційних сумішей, вивільняють залізо з білків за допомогою соляної кислоти та залізовивільняючого реагенту, інкубацією при 60°C, зупинкою реакції охолодженням, додаванням реагенту для визначення заліза, інкубацією 30 хв., приготуванням стандартів для побудови стандартної кривої в межах 0-20 нмоль, та визначають абсорбцію Fe²⁺-ферозин комплексу з максимумом поглинання $\lambda=550$ нм. Додатково використовують покращену методику ферозин-колориметричного аналізу для вивільнення заліза з тканин печінки, використовують тканину печінки щурів, готують гомогенати тканини з додаванням відповідної концентрації натрію гідрохлориду та залишають на шейкері при 25°C через ніч, стандартну криву будують в межах 0-60 нмоль.

Реалізацію заявленого способу здійснюють наступним чином.

З метою дослідження визначення концентрації загального заліза у тканині печінки щурів за допомогою ферозин-колориметричного аналізу готують гомогенати тканини з додаванням відповідної концентрації натрію гідрохлориду та залишають на шейкері при 25°C через ніч. Вивільнення заліза з білків проводять за допомогою соляної кислоти та залізовивільняючого реагенту, інкубацією при 60°C, зупинкою реакції охолодженням, додаванням реагенту для визначення заліза, інкубацією 30 хв., приготуванням стандартів для побудови стандартної кривої в межах 0-60 нмоль, та визначенням абсорбції Fe²⁺-ферозин комплексу з максимумом поглинання $\lambda=550$ нм.

Конкретний приклад застосування способу.

Для дослідження брали щурів лінії Фішер 344, які отримували уснінову кислоту в дозах 60 і 120 мг/кг маси тіла/день, або отримували дієту, яка містила 1,2 % і 2,4 % ДЕНР протягом 6 тижнів. 4 мг тканини печінки щурів гомогенізували у 500 мкл 50 мМ натрію гідрохлориду (NaOH) та залишали на шейкері при 25°C через ніч. 100 мкл отриманого лізату змішували із 100 мкл 10 мМ соляною кислотою (HCl) та 100 мкл залізовивільняючим реагентом (свіжо приготовлений розчин 1.4 М HCl та 4.5 % перманганат калію (KMnO₄) розчиненого у воді). Стандартну криву будували в межах 0-60 нмоль. Для приготування стандартів використовували 100 мкл хлориду

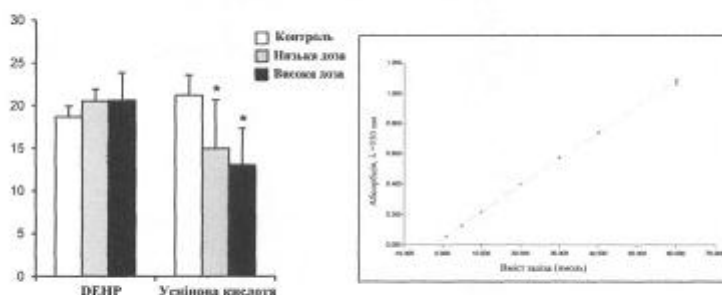
заліза (III) (FeCl_3), розчиненого у 10 мМ HCl з додаванням 100 мкл NaOH та 100 мкл залізовивільняючого реагенту. Суміш інкубували 2 год. та залишали на шейкері при 60°C . Після охолодження суміші до кімнатної температури, додавали 30 мкл реагенту для визначення заліза (6.5 мМ ферозин, 6.5 мМ неокупроїн, 2.5 М ацетат амонію та 1 М аскорбат натрію розчинених у воді). Інкубували 30 хв., після чого у 280 мкл розчину визначали абсорбцію Fe^{2+} -ферозин комплексу у 96-лунковому планшеті за допомогою мікропланшетного рідеру з максимумом поглинання $\lambda=550$ нм. Результати наведені на рисунку.

Таким чином, запропонований спосіб є швидким, дешевим і простим у виконанні та дозволяє визначити вмісту загального заліза у тканинах ссавців, зокрема в тканині печінки щурів. Також, метод має ширший діапазон визначення вмісту заліза. Спосіб може бути використаний як один з показників для діагностики патологічних станів, пов'язаних зі зміненим метаболізмом заліза.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб визначення внутрішньоклітинного заліза за допомогою ферозин-колориметричного аналізу, що включає приготування інкубаційних сумішей з додаванням лізату клітин до інкубаційних сумішей, вивільняють залізо з білків за допомогою соляної кислоти та залізовивільняючого реагенту, інкубацією при 60°C , зупинкою реакції охолодженням, додаванням реагенту для визначення заліза, інкубація 30 хв., приготування стандартів для побудови стандартної кривої в межах 0-20 нмоль, та визначають абсорбцію Fe^{2+} -ферозин комплексу з максимумом поглинання $\lambda=550$ нм, який **відрізняється** тим, що використовують покращену методику ферозин-колориметричного аналізу для вивільнення заліза з тканин печінки, використовують тканину печінки щурів, готують гомогенати тканини з додаванням відповідної концентрації натрію гідрохлориду та залишають на шейкері при 25°C через ніч, стандартну криву будують в межах 0-60 нмоль.

Конкретний приклад застосування способу визначення вмісту загального заліза у тканині печінки щурів (n=6 щурів на дозу).



Примітка * – Статистично значимі відмінності порівняно з групою контрольних тварин, $p < 0.05$.

Комп'ютерна верстка О. Рябо

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