



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **106926** (13) **U**
(51) МПК (2016.01)
G01N 21/75 (2006.01)
G01N 33/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

| | |
|--|---|
| (21) Номер заявки: u 2015 11544 | (72) Винахідник(и): Ушакова Галина Олександрівна (UA), Фоменко Ольга Зіновіївна (UA) |
| (22) Дата подання заявки: 23.11.2015 | |
| (24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.05.2016 | (73) Власник(и): ДЕРЖАВНИЙ ЗАКЛАД "ДНІПРОПЕТРОВСЬКА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ МОЗ УКРАЇНИ", вул. Дзержинського, 9, м. Дніпропетровськ, 49044 (UA), ДНІПРОПЕТРОВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ОЛЕСЯ ГОНЧАРА, пр. Гагаріна, 72, м. Дніпропетровськ, 49010 (UA) |
| (46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.05.2016, Бюл.№ 9 | |

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ЗАГАЛЬНОЇ КІЛЬКОСТІ НЕСУЛЬФАТОВАНИХ ГЛІКОЗАМІНОГЛІКАНІВ

(57) Реферат:

Спосіб визначення загальної кількості нессульфатованих глікозаміногліканів включає приготування розчину альціану блакитного, внесення у кожну кювету проби та розчину, інкубацію та реєстрацію кольорової реакції при довжині хвилі 480 нм, створення калібрувальної кривої. Аналіз проводять у нестерильних планшетах, у лунки яких вносять по 20 мкл досліджуваний біологічний матеріал. Одночасно у відповідні калібрувальні лунки вносять високоочищену гіалуронову кислоту у відповідних розведеннях як стандарт. Після чого одноразово у всі лунки додають по 200 мкл розчин барвника. Проводять інкубацію 15 хвилин та на мікропланшетному ридері визначають оптичну густину при довжині хвилі 480-492 нм.

UA 106926 U

Корисна модель належить до галузі біології і медицини, а саме до способів визначення загальної кількості нессульфатованих глікозаміногліканів, що може бути використано у лабораторній діагностиці різноманітних патологічних станів.

Відомим аналогом є спосіб визначення загальної кількості глікозаміногліканів шляхом їх осадження з наступним вимірюванням інтенсивності помутніння [1]. Як досліджуваний матеріал використовують сечу, осаджування здійснюють 96 % етанолом, який містить 1 % оцтової кислоти і 1 % оцтовокислого натрію, після чого вимірюють інтенсивність помутніння та проводять послідовне розчинення фракцій шляхом збільшення вмісту хлористого натрію в пробі з вимірюванням інтенсивності помутніння після кожного додавання 2,6 М розчину хлориду натрію.

Недоліками аналога є використання великого об'єму біологічного матеріалу, що обмежує його використання; відсутність контрольних (калібрувальних) зразків зменшує достовірність кількісної оцінки результатів.

Найближчий аналог до корисної моделі є кількісний спектрофотометричний спосіб визначення загального рівня сульфатованих глікозаміногліканів [2], який містить наступні етапи: 1 - приготування розчину альціану блакитного, що містить ацетат натрію - 0,5 М та алціан блакитний - 0,1 %.; 2-у кожному кювету вносять по 0,1 мл пробі та додають 1,2 мл розчину альціану блакитного та інкубують 15 хвилин; 3 - реєстрація кольорової реакції при довжині хвилі 480 нм, як еталонний розчин використовують 0,1 мл дистильованої води з додаванням розчину альціану блакитного; 4 - створення калібрувальної кривої за допомогою визначення кольорової реакції зі стандартними розведеннями хондроїтину сульфату; 5 - визначення загального рівня сульфатованих глікозаміногліканів за калібрувальною кривою.

Недоліками найближчого аналога є те, що для проведення аналізу потрібно мати велику кількість біологічного матеріалу та хімічних реагентів. Крім того, для кожного вимірювання необхідні одноразові кювети, оскільки барвник має високий ступінь сорбції до поверхні кювети (або після кожного вимірювання треба добре вимивати кювету 96 % етанолом), що ускладнює процедуру, збільшує похибку аналізу та високу собівартість одного аналізу.

В основу корисної моделі поставлена задача вдосконалення способу визначення загальної кількості нессульфатованих глікозаміногліканів шляхом формування нового набору та співвідношення головних компонентів, що дозволить пристосувати його для оцінки кількості нессульфатованих глікозаміногліканів у мікропробах, спростити аналіз, зменшити його вартість.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб визначення загальної кількості сульфатованих глікозаміногліканів включає приготування розчину альціану блакитного, внесення зразків та додавання розчину барвника, інкубацію протягом 15 хвилин, реєстрації кольорової реакції при довжині хвилі 480 нм, згідно з корисною моделлю, аналіз проводять у нестерильних планшетах, у лунки яких вносять по 20 мкл досліджуваного біологічного матеріалу, одночасно у відповідні калібрувальні лунки вносять високоочищену гіалуронову кислоту у відповідних розведеннях як стандарт, після чого одноразово у всі лунки додають по 200 мкл розчину барвника, проводять інкубацію 15 хвилин та на мікропланшетному ридері (наприклад, Anthos 2010, Фінляндія) визначають оптичну густину при довжині хвилі 480-492 нм.

Використання нестерильних одноразових планшетів (96-лунковий, 250-300 мкл) дозволяє використовувати малу кількість біологічного матеріалу (10-30 мкл) та зменшити загальний об'єм реакційної суміші до 250 мкл, що значно спрощує та здешевлює процес аналізу, використання як калібрувального стандарту саме високоочищеної гіалуронової кислоти є найбільш оптимальним для виявлення вірогідної різниці в кількості нессульфатованих глікозаміногліканів, одноразове вимірювання одразу 96 зразків та можливість вимірювання одних і тих самих зразків на різних термінах інкубації спрощує процедуру аналізу.

Корисну модель виконують наступним чином:

1) готують 0,1 % розчин альціану блакитного, для чого розчиняють відповідну кількість альціану блакитного 8GS (Chroma-Gesellschaft, Schmid GmbH+Co, Німеччина) у 250 мкл диметилсульфату (Sigma, США), отриману емульсію додають до 0,5М розчину ацетату натрію (рН=8,6);

2) готують калібрувальні розчини гіалуронової кислоти (Sigma, США) у дистильованій воді зі зменшенням у геометричній прогресії (з двократним розведенням), починаючи з 1 мг/мл;

3) в 2 перші колонки лунок (калібраторні лунки) плоскодонного полістерольного планшета (Microtest Plate 96, Nunc, Данія) вносять по 20 мкл калібрувального розчину, починаючи з максимальної концентрації, в останню пару лунок (контрольні лунки) вносять 10-20 мкл дистильованої води, в інші лунки попарно вносять по 10-20 мкл досліджуваної біологічної рідини (плазми крові, ліквору, тканинної фракції);

4) на наступному етапі вносять одночасно багатоканальним дозатором по 200 мкл реактиву альціану блакитного. Проводять інкубацію 15 хвилин при кімнатній температурі. Оптичну густину вимірюють при довжині хвилі 492 нм на мікропланшетному ридері;

5) для визначення концентрації гіалуронової кислоти будують калібрувальну криву на основі даних, що отримані з калібрувальних лунок.

Корисна модель пояснюється кресленням, де представлений графік рівня гіалуронової кислоти у сироватці крові щурів за моделювання хронічного гепатиту С (по групам), де К – контрольна група, КХ – група, у якій моделювався хронічний гепатит С, ХГ+Лік – група, яка отримувала лікування після моделювання хронічного гепатиту С, **- $p < 0,01$.

Для перевірки корисної моделі визначали загальну кількість нессульфатованих глікозаміногліканів при різних патологічних станах - хронічних вірусних гепатитах, цирозі печінки, при моделюванні хвороб на тваринах тощо. Результати вимірювання, що представлені на кресленні, де показали, що у тварин з моделлю хронічного гепатиту С за умов розвитку хвороби збільшувалась кількість гіалуронової кислоти у порівнянні зі здоровими тваринами, після лікування її кількість знижувалась до нормальних значень.

Корисна модель характеризується високою чутливістю, специфічністю, простотою і доступністю реагентів і може бути використаний як в клінічних, так і в науково-дослідних лабораторіях.

При виконанні корисної моделі, визначається використанням планшетів та гіалуронової кислоти, що дозволяє значно підвищити відтворюваність аналізу та зробити його значно дешевше.

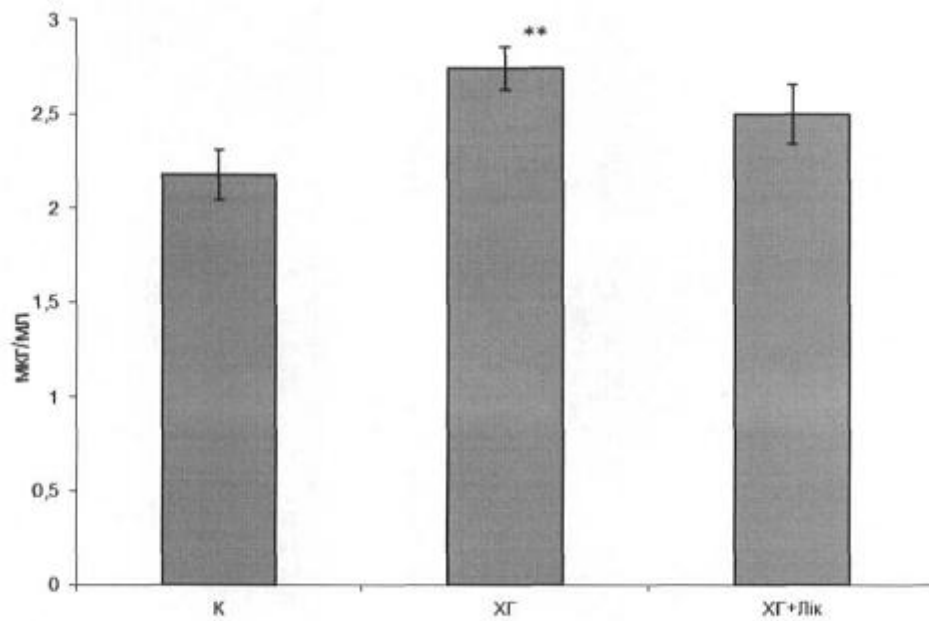
Джерело інформації:

1. U200708506, Україна, МПК⁸ G01N 33/53 (2006). Спосіб визначення глікозаміногліканів /Леонтьєва Ф.С., Тимошенко О.П., Карташов М.І., Ющенко Г.О., Кібкало Д.В., Туляков В.О., Боровков С.Б.; Заявник: Державна установа "Інститут патології хребта та суглобів ім. проф. М.І. Ситенка АМНУ", Харківська державна зооветеринарна академія - № 28147; заявл. 24.07.2007; набрано чинності. 26.11.2007.

2. Gold E.W. The quantitative spectrophotometric estimation of total sulfated glycosaminoglycan levels //Biochemica et Biophysica Acta. - 1981. - Vol. 673. - P. 408-415.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб визначення загальної кількості нессульфатованих глікозаміногліканів, що включає приготування розчину альціану блакитного, внесення у кожну кювету проби та розчину, інкубацію та реєстрацію кольорової реакції при довжині хвилі 480 нм, створення калібрувальної кривої, який **відрізняється** тим, що аналіз проводять у нестерильних планшетах, у лунки яких вносять по 20 мкл досліджуваного біологічного матеріалу, одночасно у відповідні калібрувальні лунки вносять високоочищену гіалуронову кислоту у відповідних розведеннях як стандарт, після чого одноразово у всі лунки додають по 200 мкл розчин барвника, проводять інкубацію 15 хвилин та на мікропланшетному ридері визначають оптичну густину при довжині хвилі 480-492 нм.



Комп'ютерна верстка І. Скворцова

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

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