



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **110130** (13) **C2**

(51) МПК

G01N 21/956 (2006.01)

G01N 33/48 (2006.01)

C09K 19/38 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2013 12123**

(22) Дата подання заявки: **16.10.2013**

(24) Дата, з якої є чинними
права на винахід: **25.11.2015**

(41) Публікація відомостей
про заявку: **25.09.2014, Бюл.№ 18**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **25.11.2015, Бюл.№ 22**

(72) Винахідник(и):
**Глибицький Геннадій Маркович (UA),
Глибицький Дмитро Михайлович (UA)**

(73) Власник(и):
**ІНСТИТУТ РАДІОФІЗИКИ ТА
ЕЛЕКТРОНІКИ ІМ. О.Я. УСИКОВА
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК
УКРАЇНИ,
вул. Ак. Проскури, 12, м. Харків, 61085,
Україна (UA)**

(56) Перелік документів, взятих до уваги
експертизою:
UA 86246 C2, 10.04.2009
RU 2224781 C2, 27.02.2004
Muniandy S.V. Fractal analysis of lyotropic
lamellar liquid crystal textures / S.V. Muniandy,
C.S. Kan, S.C. Lim, S. Rariman // Physica. –
2003. – А. – 323. – Р.107-123
Yi Hu. Self-assembly and fractal feature of
chitosan and its conjugate with metal ions:
Cu(II) / Ag(I) / Yi Hu, J. Cai [et al.] // Int. J. Mol.
Sci. – 2007. – Vol. 8. – Р. 1-12
Глибицький Г.М. Текстури плівок Na-DNA,
отримані з розчинів, що містять TPIC I
ЕДТА / Г.М. Глибицький, М.О. Семенов, Д.М.
Глибицький // Молекулярна біофізика. –
2011. – Вип. 27 (2). – С.26-30
Глибицький Г.М. Взаємодія ДНК з
наночастинками срібла / Г.М. Глибицький,
В.В. Джелалі, М.О. Семенов, О.Д. Рошаль // Український фізичний журнал. – 2012. – Т.57. – №7. – С.695-699

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ВПЛИВУ РЕЧОВИНИ НА БІОПОЛІМЕРИ

(57) Реферат:

Винахід належить до галузі аналітичної біотехнології, медичної техніки і фармацевтичної промисловості. Спосіб визначення впливу речовини на біополімери полягає в отриманні плівки з текстурами шляхом висушування розчину біополімера з досліджуваною речовиною. Вплив речовини визначають, виходячи з площі текстур на плівці, площі масштабно інваріантних фрактальних текстур і фрактальної розмірності текстур. Винахід забезпечує підвищення чутливості способу в порівнянні з найближчим аналогом.

UA 110130 C2

Винахід належить до аналітичної біотехнології, медичної техніки і фармацевтичної промисловості.

Спосіб може бути використаний в молекулярній фармакології та медичній біохімії для проведення відбору хімічних сполук (лікарських речовин, біологічно активних речовин (БАР) та ін.) за ступенем впливу на біополімери, зокрема на нуклеїнову кислоту (НК) і білок.

Відомий спосіб визначення впливу речовин на біополімери (на НК), згідно з яким готується поліфункціональний рідкокристалічний (РК) композит, який є продуктом тривимірної радикальної полімеризації біс-макромономера поліетиленгліколю, у водно-сольовому розчині якого сформована холестерична РК дисперсія лінійних дволанцюжкових молекул нуклеїнової кислоти (патент РФ № 2224781 від 2004 р.).

Однак цей спосіб має ряд обмежень, пов'язаних з використанням складної суміші розчину НК, який досліджується, і компонентів композиту, з дорожнечою, трудомісткістю і необхідністю у висококваліфікованому персоналі. Також немає достатніх підстав припускати, що процедура полімеризації з численними компонентами композиту не чинить побічного впливу на стан НК.

Найбільш близьким аналогом (прототипом) до об'єкта, що заявляється, є спосіб визначення впливу речовини на біополімер - нуклеїнову кислоту (патент України № 86246 від 2009 р., автори: Глибицький Г.М., Красницька А.А.). Цей спосіб передбачає формування розчину з нуклеїнової кислоти з досліджуваною речовиною (ДР), отримання плівки з текстурами та визначення коефіцієнта впливу речовини на НК, що враховує площу текстур на плівці.

Однак цей спосіб для відбору БАР і лікарських речовин має недостатню чутливість визначення впливу речовини внаслідок того, що враховується тільки площа текстур на плівці, а структурні особливості текстур не враховуються.

В основу винаходу поставлено задачу удосконалити спосіб визначення впливу речовини на біополімер шляхом врахування структурних особливостей текстур на плівці, що дозволяє підвищити чутливість методу.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі визначення впливу речовини на біополімери, який передбачає формування розчину біополімера з речовиною, отримання плівки з текстурами, визначення коефіцієнта впливу, що враховує площу текстур на плівці, згідно винаходу, додатково визначають коефіцієнти, що враховують площу масштабно інваріантних фрактальних текстур (МІФТ) і фрактальну розмірність текстур.

Відомо, що на поверхні плівок, отриманих з розчинів при вологості 0 %, що містять poly-dA * poly-dT і poly-dA-dT * poly-dA-dT та іони натрію, формуються фрактальні структури (Sclavi B. Fractal-like patterns in DNA films, B form at 0 % relative humidity, and antiheteronomous DNA: an IR study / B.Sclavi, W.L.Peticolas, J.W.Powell // Biopolymers. - 1994. - N 8 (34) (Aug.). - P. 1105-1113). При цьому припущено, що впорядковані дендритні структури (патерни) з повторюваною структурною конфігурацією формуються відрізками молекул НК.

Проведені у роботі (A study of Na-DNA films containing NaCl via scanning electron and tunneling microscopies / C.H. Mayeres, S.A. Lee, D.A. Pinnick, B.J. Carter, J. Kim // Biopolymers. - 1995. - V. 36. - P. 669-673) дослідження отриманих аналогічним чином неорієнтованих плівок Na-ДНК дозволили зробити висновки про взаємозв'язок формування кристалів хлориду натрію з формуванням патернів на поверхні плівок ДНК. Також було обґрунтовано припущення про формування молекулами ДНК упорядкованих патернів.

Таким чином, формування МІФТ на поверхні плівок НК можна пояснити тим, що молекули НК з іонами металу утворюють кристалогідратні комплекси. Зменшення площі, займаної МІФТ на поверхні плівки НК (або відсутність МІФТ) пояснюється порушенням умов, при яких утворюються кристалогідратні комплекси НК після введення у вихідний розчин досліджуваних речовин.

Утворення МІФТ відбувається і для плівок, отриманих з розчинів білків з іонами металів.

Суть винаходу пояснюється ілюстраціями, на яких представлені фотографії плівок, отриманих з розчинів НК і білків з досліджуваними речовинами:

На фігурах 1, 2, 3 - плівки НК з масштабно інваріантними фрактальними текстурами:

на фіг. 1 - досліджувана речовина - NaCl (концентрація 10 мМ);

на фіг. 2 - досліджувана речовина - KCl (концентрація 10 мМ);

на фіг. 3 - досліджувана речовина - RbCl (концентрація 10 мМ);

на фігурах 4, 5, 6 - плівки НК, що не містять масштабно інваріантних фрактальних текстур:

на фіг. 4 - досліджувана речовина - NaCl (концентрація 10 мМ) і CuCl₂ (концентрація 0,2 мМ);

на фіг. 5 - досліджувана речовина - NaCl (концентрація 10 мМ) і ZnCl₂ (концентрація 0,4 мМ);

на фіг. 6 - досліджувана речовина - NaNO₃ (концентрація 10 мМ) і AgNO₃ (концентрація 0,4 мМ);

на фігурах 7, 8 - плівки бичачого сироваткового альбуміну (БСА) і сироваткового альбуміну людини (САЛ) з масштабнo інваріантними фрактальними текстурами:

на фіг. 7 - досліджувана речовина - NaCl (концентрація 20 мМ);

на фіг. 8 - досліджувана речовина - KCl (концентрація 20 мМ);

5 на фігурах 9, 10 - плівки БСА і САЛ, що не містять масштабнo інваріантних фрактальних текстур:

на фіг. 9 - досліджувана речовина - NaCl (концентрація 20 мМ) і CuCl₂ (концентрація 0.1 мМ);

на фіг. 10 - досліджувана речовина - KCl (концентрація 20 мМ) і CuCl₂ (концентрація 0.4 мМ).

10 Спосіб, що заявляється, здійснюється наступним чином.

Формують розчин біополімера з ДР.

Висушують розчин до отримання плівки з текстурами.

Для плівки біополімера, отриманої з розчину біополімера з ДР, дія якого на біополімер досліджується, визначають коефіцієнт впливу K_T , що враховує площу текстур на плівці за

15 формулою:

$$K_T = S_T / S_{\Pi}, \quad (1)$$

де S_T - площа текстур на плівці; S_{Π} - площа всієї плівки.

Визначають коефіцієнт впливу $K_{\text{МІФТ}}$, що враховує масштабнo інваріантні фрактальні текстири:

20
$$K_{\text{МІФТ}} = S_{\text{МІФТ}} / S_{\Pi}, \quad (2)$$

де $S_{\text{МІФТ}}$ - площа масштабнo інваріантних фрактальних текстур на плівці.

Одним з параметрів, що використовуються для аналізу МІФТ, є фрактальна розмірність D , яка характеризує ступінь розгалуженості або порізаності текстури (Фізична енциклопедія. - М, 1998. - Т. 5. - С. 371). У загальному випадку D виражається у вигляді межі:

25
$$D = \lim_{\varepsilon \rightarrow \infty} \frac{\log N(\varepsilon)}{\log \varepsilon}, \quad (3)$$

де N - кількість квадратів, достатніх для покриття МІФТ (заповненої області на зображенні), ε - лінійний розмір елементів.

Для розрахунку фрактальної розмірності був застосований метод підрахунку квадратів.

30 Для кожного значення ε (із заздалегідь заданого ряду масштабів) зображення покривається квадратною сіткою зі стороною квадрата ε .

Підраховується кількість квадратів N , які містять ділянку зображення, що належить МІФТ; потім будується залежність $\log(N)$ від $\log(\varepsilon)$ і визначається регресійна пряма для цієї залежності. Кут нахилу регресійної прямої є шуканим значенням D .

Вплив досліджуваної речовини визначається як добуток цих коефіцієнтів (P):

35
$$P = K_T \cdot K_{\text{МІФТ}} \cdot D. \quad (4)$$

Приклади

Для оцінки впливу речовини (іонів металів) на біополімери були використані фотографічні зображення плівок. Розрахункові дані визначення впливу (P) ДР для плівок, представлених на Фіг. 1-10 і приготованих з відповідних розчинів, наведені в Табл. 1 і Табл. 2.

40 Розчини були отримані з суміші Na-ДНК тимуса теляти з концентрацією 0,25 мг / мл і солей металів відповідних концентрацій, а також суміші БСА та САЛ з концентрацією 0,52 мг / мл і солей металів відповідних концентрацій.

Отримані результати показують, що для іонів натрію, калію і рубідію високі значення P відповідають речовинам, у присутності яких НК знаходиться у нативному стані, а низькі значення P відповідають іонам, які збільшують частоту помилок реплікації (Infidelity of DNA synthesis in vitro: screening for potential metal mutagens of carcinogens / M.A. Sirover, L.A. Loeb // Science.-1976. - V. 194 (4272). - P.1434-1436).

Таблиця 1

Розрахункові дані визначення впливу ДР для плівок, приготованих з розчинів НК з ДР.

Досліджувана речовина	D	K _T	K _{МІФТ}	P	Частота помилок реплікації (Sirover M.A., Loeb L.A., 1976)
10mM NaCl	1,68±0,02	0,53±0,02	0,83±0,1	0,75±0,13	0,00675
10mM KCl	1,52±0,08	0,32±0,02	0,51±0,1	0,25±0,07	0,0074
10mM RbCl	1,52±0,05	0,14±0,02	0,96±0,1	0,20±0,06	0,045
0.2 mM CuCl ₂ *	1,69±0,02	0,53±0,02	0,00	0,00	36,25
0.4 mM ZnCl ₂ *	1,72±0,02	0,35±0,02	0,00	0,00	2,65
0.4mM AgNO ₃ **	1,54±0,04	0,08±0,02	0,00	0,00	61,66

*+10mM NaCl

**+10mM NaNO₃

Таблиця 2

Розрахункові дані визначення впливу ДР для плівок, приготованих з розчинів білків з ДР

Досліджувана речовина	D	K _T	K _{МІФТ}	P
BCA+20 mM NaCl	1,83±0,07	0,61±0,02	0,40±0,1	0,44833±0,14
BCA+20 mM NaCl+0,1 mM CuCl ₂	1,83±0,06	0,20±0,02	0,00	0,00000
САП+KCl 20 mM	1,85±0,06	0,50±0,02	0,01±0,003	0,00925±0,003
САП+20 mM NaCl+0,4 mM CuCl ₂	1,84±0,07	0,19±0,02	0,00	0,00000

5

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- Спосіб визначення впливу речовини на біополімери, який передбачає формування розчину біополімера з речовиною, отримання з розчину плівки з текстурами, визначення коефіцієнта впливу, що враховує площу текстур на плівці, який **відрізняється** тим, що додатково визначають коефіцієнти, що враховують площу масштабно інваріантних фрактальних текстур і фрактальну розмірність текстур.
- Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що коефіцієнт, що враховує площу текстур на плівці:

$$K_T = S_T / S_{\Pi},$$
 де S_T - площа текстур на плівці, S_{Π} - площа всієї плівки; коефіцієнт, що враховує масштабно-інваріантні фрактальні текстури:

$$K_{МІФТ} = S_{МІФТ} / S_{\Pi},$$
 де $S_{МІФТ}$ - площа масштабно інваріантних текстур на плівці; коефіцієнт, що враховує фрактальну розмірність текстур, розраховується методом підрахунку квадратів:

$$D = \lim_{\varepsilon \rightarrow \infty} \frac{\log N(\varepsilon)}{\log \varepsilon},$$
 де N - кількість квадратів, достатніх для покриття текстури,
 ε - лінійний розмір квадрата,
 а вплив P речовини визначається як добуток цих коефіцієнтів:

$$P = K_T \cdot K_{МІФТ} \cdot D.$$

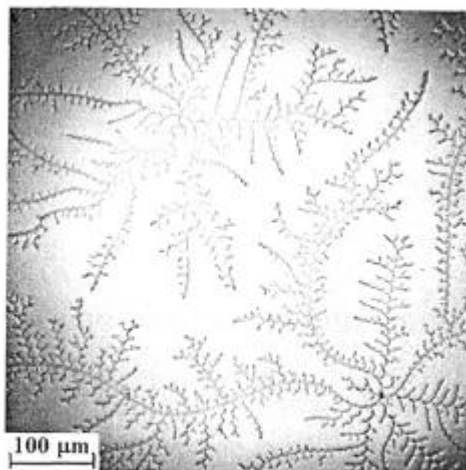


Fig. 1

Фотографія плівки, отриманої з розчину, який містить 10 мМ NaCl+Na-ДНК

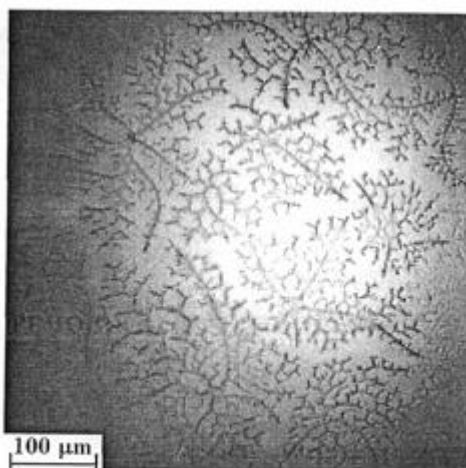


Fig. 2

Фотографія плівки, отриманої з розчину, який містить 10 мМ KCl+Na-ДНК

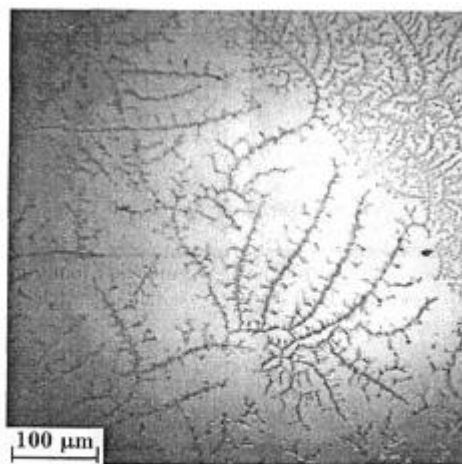
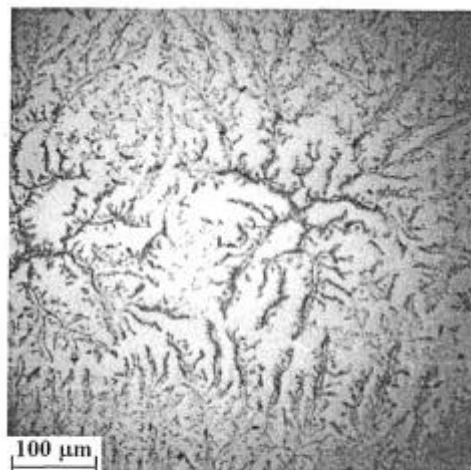


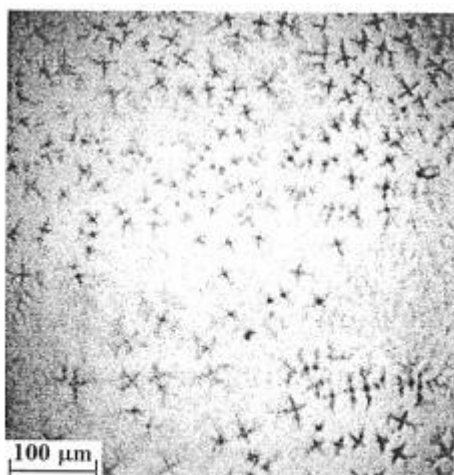
Fig. 3

Фотографія плівки, отриманої з розчину, який містить 10 мМ RbCl+Na-ДНК



Фіг. 4

Фотографія плівки, отриманої з розчину,
який містить 10 мМ NaCl+0,2 мМ CuCl₂+ Na-ДНК



Фіг. 5

Фотографія плівки, отриманої з розчину,
який містить 10 мМ NaCl+0,4 мМ ZnCl₂+Na-ДНК

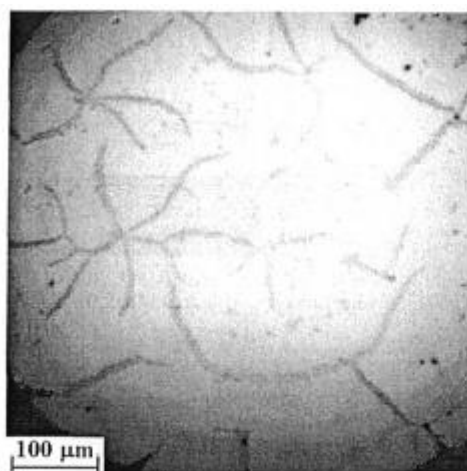


Fig. 6

Фотографія плівки, отриманої з розчину, який містить 10 мМ NaNO_3 +0,4 мМ AgNO_3 +Na-ДНК

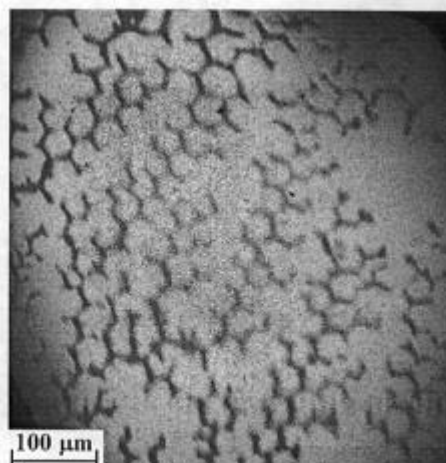


Fig. 7

Фотографія плівки, отриманої з розчину, який містить 20 мМ NaCl + БСА

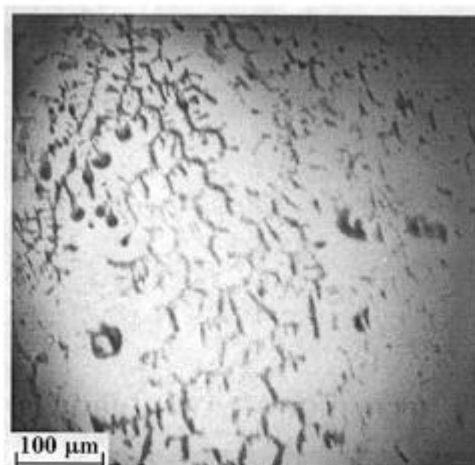
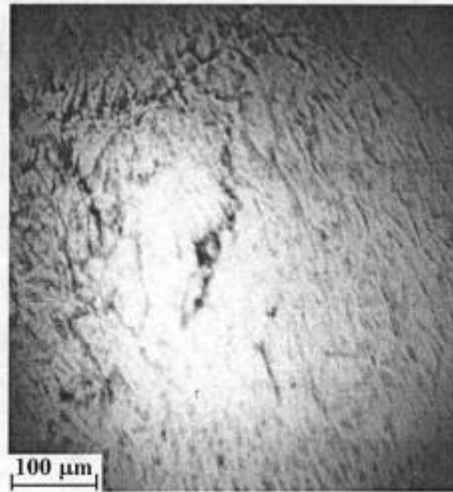


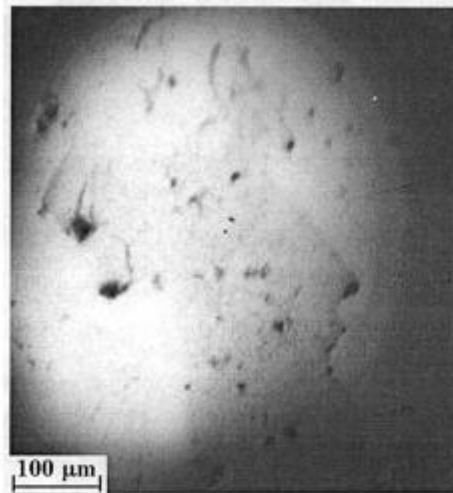
Fig. 8

Фотографія плівки, отриманої з розчину, який містить 20 мМ KCl + САЛ



Фіг. 9

Фотографія плівки, отриманої з розчину, який містить 20 мМ NaCl+0.1 мМ CuCl₂+БСА



Фіг. 10

Фотографія плівки, отриманої з розчину, який містить 20 мМ KCl+0.4 мМ CuCl₂+САЛ