



УКРАЇНА

(19) UA (11) 16145 (13) U
(51) МПК (2006)
G01N 33/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ІНОЗИТОЛФОСФАТІВ

1

2

(21) u200602312

(22) 02.03.2006

(24) 17.07.2006

(46) 17.07.2006, Бюл. № 7, 2006 р.

(72) Горбач Тетяна Вікторівна, Денисенко Світлана
Андріївна, Пушкар Юрій Якович(73) ХАРКІВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ(57) Спосіб визначення інозитолфосфатів, що
включає паперову хроматографію і кількісний ана-
ліз, який **відрізняється** тим, що інозитолфосфати
визначають у сечі.

Корисна модель відноситься до медицини, а саме до біохімічних досліджень, і може бути використана для визначення інозитолфосфатів у біологічних рідинах і тканинах.

Інозитолфосфати є продуктами гідролізу поліфосфоінозитидів.

Поліфосфоінозитиди відіграють головну роль при передачі сигналів у відповідь на дію багатьох гормонів, нейромедіаторів і ростових факторів. Перша реакція на гормон або ліганд складається в прискоренні гідролізу фосфатидіінозитол-4,5-біфосфата до діацилгліцеролу і інозитол-1,4,5-трифосфата. Обидва вони функціонують як вторинні посередники: діацилгліцерол активізує протеїнкіназу C, а інозитолтрифосфат мобілізує кальцій з мембранозв'язаних депо, таких як цистерни ендоплазматичного ретикула. Інозитолтрифосфат піддається подальшому гідролізу, даючи інозитолбіфосфат, інозитолмонофосфат і, нарешті, інозитол. Останній потім включається у фосфатидилінозитол, який фосфорилується з утворенням спочатку фосфатидилінозитол-4-фосфату, а потім фосфатидилінозитол-4,5-біфосфату [Селищева Д.К., Козлов Ю.П. Метаболізм фосфолипидов и биологические мембраны. - Иркутск: изд-во Иркутского ун-та, 1998. - 86 с.].

При усіх формах гломерулонефриту, пієлонефриті, тубулоінтерстиційному нефрозі й ін. захворюваннях нирок відбувається масивний гідроліз поліфосфоінозитидів мембран нефроцитів, в результаті чого інозитолфосфати з'являються в сечі. По їхній кількості і фракційному складу можна судити про наявність і стадію захворювання. Тому визначення кількості інозитолфосфатів у сечі є важливою задачею клініко-лабораторної діагностики.

Відомий метод визначення інозитолфосфатів

у тканинах - метод високоефективної рідинної хроматографії, розроблений Helsop J.P. і співавторами [Helsop J.P., Irvine K.P., Tashijana A., Berridge M.J. // J. Exp. Biol. - 1985. - Vol. 119. - P. 395-400.].

Метод включає наступні етапи: 1) екстракція ліпідів і лужний гідроліз; 2) ліофілізація зразків; 3) рідинна хроматографія.

Недоліками цього методу є те, що він призначений для визначення інозитолфосфатів у тканинах і вимагає для цього дорогу апаратуру.

В даний час існує також метод визначення інозитолфосфатів у тканинах - метод колоночної хроматографії [Irvine K.F., Brown K.D., Berridge M.J. The method for identification of the inositolphosphates // Biochem. J. - 1984. - Vol. 22. - P. 269-271].

Метод включає наступні етапи: 1). лужний гідроліз ліпідів; 2). хроматографія інозитолфосфатів на колонці з дауексом; 3). кількісне визначення інозитолфосфатів (по фосфору).

Даний метод визначення інозитолфосфатів є найбільш близьким по технічній суті і результату, який може бути досягнутим, до того, що заявляється, тому він обраний як найближчий аналог.

Недоліком методу є те, що він призначений для визначення інозитолфосфатів у тканинах, вимагає спеціальні колонки зі смолою Dowen 1x8 200-400 mesh.

У зв'язку з вищевикладеним, в основу корисної моделі покладена задача розширення арсеналу біологічних середовищ для визначення інозитолфосфатів.

Задача, покладена в основу корисної моделі, вирішується тим, що у відомому способі визначення інозитолфосфатів, що включає паперову хроматографію і кількісний аналіз, відповідно до корисної моделі, інозитолфосфати визначають у сечі.

(19) UA (11) 16145 (13) U

Позитивний ефект корисної моделі полягає в тому, що можливість визначення інозитолфосфатів у сечі не тільки розширює арсенал біологічних середовищ для їхнього визначення, але і робить метод більш доступним і простим для клінічних лабораторій (у тканинах багато мононуклеотидфосфатів, тому потрібний додатковий етап - розподіл на колонках з дауексом).

Метод здійснюють наступним чином:

Хроматографія інозитолфосфатів на папері. Розподіл проводять за допомогою нисхідної хроматографії на папері ватман №1, використовуючи систему розчинників ізопропанол: насичений аміак / вода (7:5:2 V/V). Обсяг нанесених проб - 10мкл.

Хроматограму проявляють наступним реагентом: 5мл 60% хлорної кислоти з 10мл 1М HCl і 25мл 4% молібдату амонію, вода до 100мл. Підсушують папір при кімнатній температурі й опромінюють УФ-світлом. Виявляються блакитні плями інозитолфосфатів. Ідентифікацію плям роблять або по стандартних зразках, або за коефіцієнтом розподілу (Rf). Для інозитолмонофосфату в даній системі розчинників Rf=0,6; для інозитолбіфосфату - 0,36; для інозитолтрифосфату - 0,16. Кількісний аналіз проводять у такий спосіб: плями зскрібають, зіскрібки поміщають у пробірки, що містять 1мл 5% молібденового амонію, перемішують, центрифугують. До надосадової рідини додають 0,2мл ейконогена (0,1г у 25мл 24% бісульфату натрію) і 1,8мл води, перемішують. Через 20хв. фотометрують при $\lambda=630-690\text{nm}$ у кюветах 1см

проти холостого досліджу.

При вмісті білка в сечі більш 1% у 4мл сечі добової додають 1,5мл 10% трихлороцтової кислоти для осадження білка. Денатуровані білки осаджують центрифугуванням (5хв. при 3000d). Надосадову рідину випарюють на водяній бані при температурі 80°C до обсягу 0,5мл.

Ефективність методу ілюструє наступний приклад:

Визначаємо вміст інозитолфосфатів у цитоплазмі нирок за методом – найближчим аналогом і у сечі методом, що заявляється.

У цитоплазмі нирок вміст: інозитолмонофосфату - $0,87 \pm 0,05 \text{ ммоль/г}$ білка; інозитолдіфосфату - $1,93 \pm 0,12 \text{ ммоль/г}$ білка; інозитолтрифосфату - $0,53 \pm 0,03 \text{ ммоль/г}$ білка; сума інозитолів - $3,32 \pm 0,21 \text{ ммоль/г}$ білка.

У сечі вміст: інозитолмонофосфату - $1,45 \pm 0,11 \text{ ммоль/л}$; інозитолдіфосфату - $3,18 \pm 0,19 \text{ ммоль/л}$; інозитолтрифосфату - $2,38 \pm 0,16 \text{ ммоль/л}$; сума інозитолів - $7,11 \pm 0,31 \text{ ммоль/л}$.

Коефіцієнт кореляції суми інозитолфосфатів у нирках і сечі - $\tau=+0,94$; для інозитолмонофосфату - $\tau=+0,87$; для інозитолдіфосфату - $\tau=+0,94$; для інозитолтрифосфату - $\tau=+0,85$. Високі коефіцієнти кореляції свідчать про адекватність визначення інозитолфосфатів у цитоплазмі нирок та сечі.