



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **86573**

(13) **U**

(51) МПК

**G01N 33/68** (2006.01)

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2013 05758**

(22) Дата подання заявки: **07.05.2013**

(24) Дата, з якої є чинними  
права на корисну  
модель: **10.01.2014**

(46) Публікація відомостей  
про видачу патенту: **10.01.2014, Бюл.№ 1**

(72) Винахідник(и):

**Снітинський Володимир Васильович  
(UA),  
Онисковець Марта Ярославівна (UA)**

(73) Власник(и):

**ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ  
АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ,  
вул. Володимира Великого, 1, м. Дубляни,  
Жовківський р-н, Львівська обл., 80381 (UA)**

## (54) СПОСІБ ОЦІНКИ ТОКСИЧНОЇ ДІЇ СВИНЦЮ У КОРОПА ЛУСКАТОГО

(57) Реферат:

Спосіб оцінки токсичного впливу іонів свинцю у коропа лускатого, що включає відбір зразків печінки, їх лізис та дослідження активності печінкових ферментів, при якому як біологічний маркер використовують білок теплового шоку Hsp60.

**UA 86573 U**



Корисна модель належить до біології, ветеринарії та медицини, зокрема до методів оцінки токсичного впливу свинцю, і може бути використана в діагностичних установах та у лабораторіях референт-центрів.

Із рівня техніки відомий ряд способів оцінки токсичного впливу свинцю на організм тварин [1]. Зокрема, для такої оцінки використовують печінкові ферменти [2], вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів [3] та антиоксидантних ферментів [4]. Проте, недоліком цих способів є невисока чутливість, що не дозволяє однозначно стверджувати про токсичність іонів свинцю. В той же час білки теплового шоку, які являють собою один із найхарактерніших маркерів токсичної інтоксикації та загального стресу організму [5], взагалі не використовувалися для оцінки токсичного впливу важких металів у промислових риб, а, зокрема, коропа лускатого.

Найбільш близьким до запропонованого способу є оцінка токсичного впливу цинку шляхом дослідження активності печінкових ферментів, зокрема, аспартат- та аланінамінотрансферази [2]. Недоліком даного способу є те, що на вищевказані ензими впливає ціла низка інших біогенних та абіогенних факторів, що значно підвищує ризик отримання недостовірних результатів.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити швидкий та ефективний метод оцінки токсичного впливу свинцю на організм коропа лускатого на основі детекції вмісту білка теплового шоку Hsp60. Технічний результат досягається шляхом використання методу точкової гібридизації для визначення рівня білка Hsp60 з використанням специфічних моноклональних антитіл.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі оцінки токсичного впливу іонів свинцю у коропа лускатого, що включає відбір зразків печінки, лізис та дослідження активності печінкових ферментів шляхом маркування з подальшою детекцією, згідно з корисною моделлю, як біологічний маркер використовують білок теплового шоку Hsp60.

Визначення рівня білка теплового шоку Hsp60 дає можливість точно оцінити токсичний вплив іонів свинцю. Також вдається усунути недолік неспецифічної позитивної реакції, притаманний вищеописаному способу, який базується на дослідженні активності печінкових ферментів.

Спосіб здійснюють таким чином.

1. Розморожену чи щойно відібрану тканину печінки лізують у десятикратному об'ємі буферу для лізування, pH 7,4 (15 % N-лаурилсаркозин, 20 мкМ фенілметилсульфонілфторид, 15 мкМ N-етилмалеймід в 0,02 М натрій-фосфатному буфері). Далі відцентрифугують зразки при 5 тис. g протягом 30 хв. при 4 °C. Вимірюють концентрацію білка у лізатах методом Лоурі. Для вирівнювання об'ємів та концентрацій загального білка розводять зразки буфером для розведення зразків, pH 7,4 (35 мМ Tris-HCl, 100 мМ NaCl, 2,0 мМ KCl).

2. На нітроцелюлозну мембрану (Millipore) наносять лізат об'ємом 2 мкл із однаковим загальним вмістом білка. Для виявлення фонового свічення на мембрану наносять буфер для лізування та буфер для розведення зразків.

3. Блокують мембрану протягом 1 год. в 5 % розчині альбуміну. Після нанесення контрольних та дослідних зразків інкубують мембрану з моноклональними анти-Hsp60 антитілами (Sigma-Aldrich, США) - 1:5000 у ЗФРТ 120 хв., та поліклональними козячими антимішачими антитілами, кон'югованими з лужною фосфатазою (Sigma, США) - 1:5000 у ЗФРТ 60 хв. Здійснюють детекцію імунних комплексів з використанням комерційного розчину субстрату для лужної фосфатази - CDP-Star (Tropix, Велика Британія). Проводять візуалізацію за допомогою рентгенівської плівки ECL HyperFilm (Amersham, США) та набору для проявки плівок (Kodak).

Для тестування ефективності запропонованого методу оцінки токсичності іонів свинцю було проведено дослідження вмісту білка Hsp60 в печінці коропа лускатого за дії іонів свинцю.

Дослідження проводили у 4-ох групах зразків печінки:

1. Контрольний;

2. Перший дослідний - тварин інкубували 96 год. В водному середовищі з концентрацією іонів свинцю 0,2 мг/л;

3. Другий дослідний - тварин інкубували 96 год. В водному середовищі з концентрацією іонів свинцю 0,5 мг/л;

4. Третій дослідний - тварин інкубували 96 год. В водному середовищі з концентрацією іонів свинцю 5 мг/л;

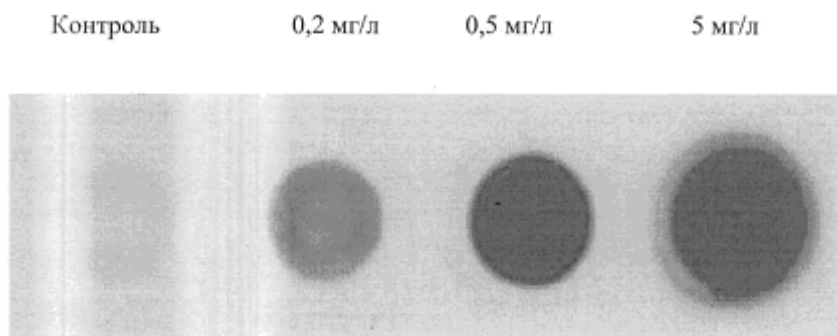
У печінці досліджуваних тварин було відмічено аналогічну до лейкоцитів картину, відповідно до якої усі застосовані концентрації іонів свинцю викликали вірогідне ( $p < 0,001$ ) зростання концентрації Hsp60 (кресл.), причому найвищий рівень білка теплового шоку було відмічено за дії 5 мг/л іонів свинцю.

Джерела інформації:

1. Tvrda E, Knazicka Z, Lukac N. Selected heavy metals versus antioxidant parameters in bull seminal plasma-a comparative study. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.* 2012;47(9): 1261-6.
- 5 2. Low lead doses and atherogenic diet in rabbits: biochemical results in blood. Speich M, Metayer C, Arnaud P, Nguyen VG, Bousquet B, Boiteau HL. *Ann Nutr Metab.* 1983;27(6):521-30.
3. Locomotor damage and brain oxidative stress induced by lead exposure are attenuated by gallic acid treatment. Reckziegel P, Dias VT, Benvegnu D, Boufleur N, Silva Barcelos RC, Segat HJ, Pase CS, Dos Santos CM, Flores EM, Burger ME. *Toxicol Lett.* 2011 May 30;203(1):74-81. Epub 10 2011 Mar 22.
4. Alleviation of lead poisoning in the brain with aqueous leaf extract of the *Thunbergia laurifolia* (Linn.). Tangpong J, Satarug S. *Toxicol Lett.* 2010 Sep 15;198(1):83-8. Epub 2010 May 11.
5. *Annu. Rev. Genet.* 1988. 22:631-77 THE HEAT-SHOCK PROTEIN.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб оцінки токсичного впливу іонів свинцю у коропа лускатого, що включає відбір зразків печінки, їх лізис та дослідження активності печінкових ферментів, який **відрізняється** тим, що як біологічний маркер використовують білок теплового шоку Hsp60.




---

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

---

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