



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **120776** (13) **C2**
(51) МПК
G01N 33/52 (2006.01)
G01N 21/64 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: а 2017 10695 (22) Дата подання заявки: 03.11.2017 (24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 10.02.2020 (41) Публікація відомостей про заявку: 10.04.2018, Бюл.№ 7 (46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.02.2020, Бюл.№ 3	(72) Винахідник(и): Гороховський Єгор Юрійович (UA) (73) Власник(и): ЗАПОРІЗЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, вул. Жуковського, 66, м. Запоріжжя, 69600 (UA) (56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: UA 33781 A, 15.02.2001 UA 57367 U, 25.02.2011 BY 20134 C1, 30.06.2016 CN 104198449 A, 10.12.2014 Гороховський Є.Ю. Вміст цинку та секреторного матеріалу в клітинах панета іммобілізованих тварин / Є.Ю. Гороховський, Ю.В. Єщенко, Н.В. Григорова и др. // Вісник Запорізького національного університету. Біологічні науки. Розділ 3. Фізіологія людини та тварин. - 2009. - №1. - С. 68-72 Григорова Н.В. Вміст цинку та секреторного матеріалу в клітинах адреналектомованих щурів / Н.В. Григорова // Вісник Запорізького національного університету. Серія: біологічні науки. Зб. наук. статей. - Запоріжжя: ЗНУ. - 2008. - № 2. - С. 33-36 Єщенко В.А. Вміст цинку та секреторного матеріалу в клітинах Панета мишей і щурів різного віку / В.А. Єщенко, Н.В. Григорова, Н.Л. Петриченко // Актуальні питання біології, екології та хімії. - 2012. - №1. - С. 30-34 Smith G.L. A fluorescent method for the detection and localization of zinc in human granulocytes / G.L. Smith, R.A. Jenkins, J.F. Gougii // The journal of histochemistry and cytochemistry. - 1969. - V. 17. - N. 11. - P. - 749-750
---	---

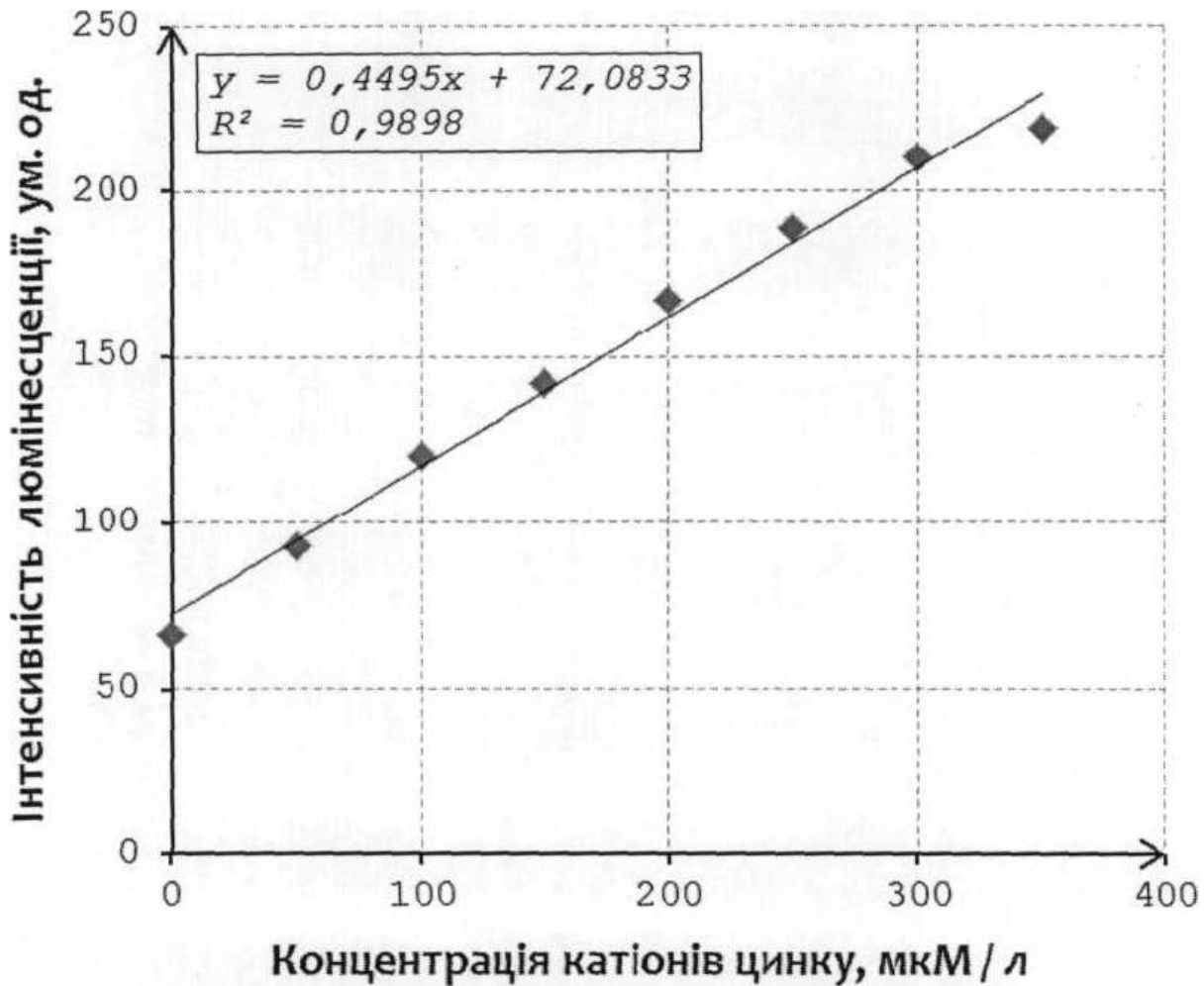
(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ КАТІОНІВ ЦИНКУ В БІОЛОГІЧНОМУ МАТЕРІАЛІ

(57) Реферат:

Винахід належить до експериментальної біології, медицини та клінічної діагностики. Для визначення катіонів цинку в біологічному матеріалі відбирають зразок біологічного матеріалу та розподіляють його на контрольний та дослідний зразки. Дослідний зразок фіксують в фіксувальній рідині, яка містить осаджувач катіонів цинку, вибраний з сульфідів лужних металів, сульфиду амонію, тіосульфату, тіоацетаміду або тіоформаміду, і виготовляють з нього

UA 120776 C2

мікропрепарати. Контрольний зразок фіксують у фіксувальній рідині, виготовляють з нього мікропрепарати, з яких видаляють ендogenousний цинк. Витримують мікропрепарати "нульового" контрольного зразка у бідистильованій воді, а інші мікропрепарати контрольного зразка - у стандартних розчинах солі цинку. Забарвлюють мікропрепарати дослідного і контрольного зразків флуорохромним аналітичним реагентом на катіони цинку, промивають їх у бідистильованій воді, замикають у нефлуоресцентне середовище під покривні скельця. Визначають інтенсивність люмінесцентної реакції аналітичного реагенту з катіонами цинку та здійснюють побудову калібрувального графіку, за яким визначають концентрацію катіонів цинку в клітинах. Спосіб є селективним, стабільним, точним та дозволяє кількісно визначати катіони цинку у зразках біологічного матеріалу або окремих клітинах організмів.



Фіг. 1

Спосіб належить до експериментальної біології та медицини, а також клінічної діагностики і дозволяє визначати вміст катіонів цинку в зразках біологічних тканин або окремих клітинах організмів.

Відомий спосіб визначення катіонів цинку у біологічному матеріалі [Smith G. L. A fluorescent method for the detection and localization of zinc in human granulocytes / G. L. Smith, R. A. Jenkins, J. F. Gougii // The journal of histochemistry and cytochemistry. - 1969. - V. 17, № 11. P. - 749-780], який передбачає взяття зразка крові; виготовлення контрольного та дослідного мікропрепаратів; обробку контрольного мікропрепарату розчином оцтової кислоти для видалення ендogenous цинку; флуорохромування мікропрепаратів впродовж 15 хв. розчином 8-гідроксихіноліну; промивання їх дистильованою водою та висушування на повітрі, монтування у краплю нелюмінесцентної імерсійної олії, дослідження мікропрепаратів за допомогою люмінесцентного мікроскопа при довжині хвилі збуджувального світла 358 нм; визначення в клітинах крові катіонів цинку за жовто-зеленим світінням.

Ознаками спільними з аналогом є:

взяття зразка біологічного матеріалу;
виготовлення контрольного та дослідного мікропрепаратів;
видалення з контрольного мікропрепарату ендogenous цинку;
забарвлення мікропрепаратів флуорохромним аналітичним реагентом на катіони цинку;
промивання мікропрепаратів дистильованою водою;
монтування мікропрепаратів у нелюмінесцентне середовище;
дослідження мікропрепаратів за допомогою люмінесцентного мікроскопа;
визначення в клітинах катіонів цинку.

До суттєвих недоліків аналогу належить те що, по-перше 8-гідроксихінолін не є селективним до катіонів цинку аналітичним реагентом і здатен утворювати комплексні сполуки (хінолінати) з катіонами кальцію та магнію, які у значній кількості наявні в клітинах, і також мають здатність до люмінесценції. По-друге, реакція 8-гідроксихіноліну з катіонами цинку є відносно малочутливою [Живописцев В. П. Аналитическая химия цинка / В. П. Живописцев, Е. А. Селезнева. - М.: Наука, 1975. - 200 с]. По-третє, даний спосіб є якісним, і не дозволяє встановлювати концентрацію катіонів цинку в клітинах, а лише підтверджує факт їх наявності. Також цей спосіб неможливо використовувати для визначення катіонів цинку в попередньо фіксованих зразках біологічного матеріалу, оскільки під час фіксації катіони даного металу втрачаються шляхом дифузії зі зразків у фіксувальну рідину.

Найбільш близьким за суттю та досягнутим результатом є відомий спосіб визначення катіонів цинку в біологічному матеріалі [Торопцев И. В. Экспериментальный дитизоновый диабет / И. В. Торопцев, В. А. Ещенко. - Томск: Изд-во Томского университета, 1975. - 126 с], за яким готують стандартні розчини цинку 8-(п-толуолсульфоніламіно)-хіноліну ($Zn(8-TSX)_2$) із концентрацією 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 мкг/мл, вимірюють інтенсивність їх люмінесценції, занурюючи об'єкти мікрофлюориметра на глибину 30 мкм за допомогою мікрометричного гвинта мікроскопа. За отриманими даними будують калібрувальний графік.

Потім здійснюють взяття зразка біологічного матеріалу; фіксують його у холодному етанолі, насиченому водню сульфідом; виготовляють мікропрепарати, які забарвлюють 0,01 % ацетоновим розчином 8-(п-толуолсульфоніламіно)-хіноліну (8-TSX); підсушують їх на повітрі; замикають у гліцерин; вимірюють за допомогою мікрофлюориметра (світлофільтри ФС-1, ЖС-18) інтенсивність люмінесцентної реакції 8-TSX з цинком у клітинах; визначають концентрацію цинку за допомогою калібрувального графіку.

Ознаками, спільними з прототипом, є:

взяття зразка біологічного матеріалу;
фіксування зразка в фіксувальній рідині, яка містить осаджувач катіонів цинку;
виготовлення мікропрепаратів;
забарвлення мікропрепаратів флуорохромним аналітичним реагентом на катіони цинку;
промивання їх у бідистильованій воді;
замикання у нефлуоресцентне середовище під покривне скельце;
визначення інтенсивності люмінесценції аналітичного реагенту з катіонами цинку;
побудова калібрувального графіку;
визначення концентрації катіонів цинку в клітинах за калібрувальним графіком.

Основним недоліком цього способу є те, що використання стандартних розчинів комплексу $Zn(8-TSX)_2$ для побудови калібрувального графіку не відповідає реальним умовам вимірювання концентрації катіонів цинку в мікропрепаратах, тому що: а) оптичні властивості калібрувального розчину та мікропрепаратів (оптична щільність, здатність до поглинання та відбиття світла) не є ідентичними; б) при побудові калібрувального графіку відсутні предметне та покривне скельця,

замикаюче та імерсійне середовища, які використовують при вимірюванні концентрації катіонів цинку у мікропрепаратах; в) не береться до уваги інтенсивність аутофлуоресценції досліджуваного мікропрепарату. Отже, без врахування цих факторів, які важливі для мікрофотометричного визначення концентрації речовин, точність вимірювань суттєво знижується.

Окрім цього, складність точного контролю занурення об'єктива мікрофлюориметра на певну визначену глибину, що здійснюється лише за допомогою мікрометричного гвинта мікроскопа, також може призводити до суттєвої похибки при проведенні процедури калібрування, оскільки інтенсивність люмінесценції суттєво залежить від товщини шару речовини у кюветі.

Для запобігання втрати катіонів цинку зі зразків у фіксуючу рідину у вищезазначеному способі використовують етанол, насичений Гідрогену сульфідом, ступінь розчинення якого не є постійною величиною і суттєво залежить від температури, швидкості потоку газу крізь розчин, ступеня розпилення тощо, тому дуже важко, або навіть неможливо, встановити точну концентрацію Гідрогену сульфиду у етанолі, що знижує відтворюваність результатів дослідження. До того ж, Гідрогену сульфід є надзвичайно токсичною для людини сполукою [Чертков Я. Б. Неуглеводородные соединения в нефтепродуктах / Я. Б. Чертков. - М.: Химия, 1964. - 320 с], тому робота із ним потребує особливих умов зберігання та спеціального обладнання для його дезактивації.

В основу винаходу поставлено задачу розробити спосіб визначення катіонів цинку в біологічному матеріалі, який шляхом фіксації зразка біологічного матеріалу фіксувальною рідиною, яка містить осаджувач катіонів цинку, виготовлення та флуорохромування мікропрепаратів селективним до катіонів цинку органічним реагентом та визначення інтенсивності люмінесцентної реакції, дозволяє здійснювати кількісне визначення катіонів цинку, яке є селективним, стабільним та більш точним.

Суттєвими ознаками способу є:
взяття зразка біологічного матеріалу;
розподілення зразка на контрольний та дослідний;
фіксування контрольного зразка в фіксувальній рідині, а дослідного - у фіксувальній рідині, із додаванням осаджувача катіонів цинку (сульфиду лужного металу або сульфиду амонію або тіосульфату або тіоацетаміду або тіоформаміду);
виготовлення мікропрепаратів зі зразків;
видалення з мікропрепаратів контрольного зразка ендogenous цинку;
розподілення мікропрепаратів контрольного зразка на декілька груп;
витримування мікропрепаратів "нульового" контрольного зразка у бідистильованій воді;
витримування інших мікропрепаратів контрольного зразка у стандартних розчинах солі цинку;
забарвлення мікропрепаратів контрольного зразка флуорохромним аналітичним реагентом на катіони цинку;
промивання мікропрепаратів у бідистильованій воді та замикання їх у нефлуоресцентне середовище під покривні скельця;
визначення інтенсивності люмінесценції мікропрепаратів контрольного зразка;
побудова калібрувального графіку шляхом відкладання значень інтенсивності люмінесценції на вертикальній осі калібрувального графіку, а на горизонтальній осі - значень концентрації стандартних розчинів цинку;
забарвлення мікропрепаратів дослідного зразка біологічного матеріалу флуорохромним аналітичним реагентом на катіони цинку;
промивання їх у бідистильованій воді;
замикання у нефлуоресцентне середовище під покривні скельця;
визначення інтенсивності люмінесцентної реакції аналітичного реагенту з катіонами цинку;
визначення концентрації катіонів цинку в зразках біологічного матеріалу за калібрувальним графіком.

Відмінними від найближчого аналогу ознаками способу є те, що:
виконують розподілення зразка біологічного матеріалу на контрольний та дослідний;
фіксують контрольний зразок у фіксувальній рідині;
як осаджувач катіонів цинку використовують: сульфід лужних металів або сульфід амонію, або тіосульфат, або тіоацетамід, або тіоформамід;
видаляють з мікропрепаратів контрольного зразка ендogenous цинк;
розподіляють мікропрепарати контрольного зразка на декілька груп;
витримують мікропрепарати "нульового" контрольного зразка у бідистильованій воді;
витримують інші мікропрепарати контрольного зразка у стандартних розчинах солі цинку;

забарвлюють мікропрепарати контрольного зразка флуорохромним аналітичним реагентом на катіони цинку;

промивають мікропрепарати у бідистильованій воді та замикають їх у нефлуоресцентне середовище під покривні скельця;

- 5 визначають інтенсивність люмінесценції мікропрепаратів контрольних зразків;
будують калібрувальний графік за отриманими значеннями інтенсивності люмінесценції контрольних зразків біологічного матеріалу, за якими визначають концентрацію катіонів цинку.

Спосіб здійснюють так. Беруть зразок біологічного матеріалу, розподіляють зразок на контрольний та дослідний. Фіксують контрольний зразок у фіксувальній рідині, а дослідний - у
10 фіксувальній рідині, що додатково містить осаджувач катіонів цинку (сульфід лужного металу або сульфід амонію, або тіосульфат, або тіоацетамід, або тіоформамід). Виготовляють мікропрепарати за стандартною методикою.

Будують калібрувальний графік, для чого видаляють з мікропрепаратів контрольного зразка
15 ендogenous цинк, розподіляють мікропрепарати контрольного зразка на декілька груп, витримують мікропрепарати "нульового" контрольного зразка у бідистильованій воді, а інші - у стандартних розчинах солі цинку.

Забарвлюють мікропрепарати контрольного зразка флуорохромним аналітичним реагентом на катіони цинку, промивають їх у бідистильованій воді та замикають їх у нефлуоресцентне середовище під покривні скельця. Після цього визначають інтенсивність люмінесценції
20 мікропрепаратів контрольного зразка. За отриманими даними будують калібрувальний графік.

Забарвлюють мікропрепарати дослідного зразка біологічного матеріалу флуорохромним аналітичним реагентом на катіони цинку, промивають їх у бідистильованій воді та замикають у нефлуоресцентне середовище під покривні скельця. Визначають інтенсивність люмінесцентної реакції аналітичного реагенту з катіонами цинку, та за калібрувальним графіком знаходять
25 концентрацію катіонів цинку в зразках.

Приклад конкретного виконання.

Досліджували концентрацію цинку в клітинах Панета клубової кишки щурів, для чого використали 6 нелінійних щурів, віком 9-12 міс. Зразки біологічного матеріалу (відрізок клубової
30 кишки) відбирали у тварин після евтаназії, яку здійснювали шляхом передозування інгаляційного анестетику (діетилового ефіру). Усі маніпуляції виконували із дотриманням вимог щодо гуманного поводження із лабораторними тваринами.

Зразок розподіляли на дві частини - контрольну та дослідну. Контрольну частину фіксували у 10 % розчині формаліну, а дослідну - у 10 % розчині формаліну, який додатково містив тіоацетамід у концентрації 0,1 %. Час фіксації в обох випадках складав 24 год.

35 Виготовляли мікропрепарати, для чого фіксовані зразки зневоднювали у ізопропанолі, просвітлювали у ксилолі, просочували парафіном та заливали у парафінові блоки, з яких робили мікромомні зрізи 10 мкм завтовшки, які наклеювали на предметні скельця.

Калібрувальний графік для визначення концентрації катіонів цинку у клітинах Панета клубової кишки будували так: готували серію стандартних розчинів сульфату цинку із
40 концентрацією катіонів цинку у розчині від 50 до 350 мкМ/л, з кроком 50 мкМ. Виготовлені мікромомні зрізи депарафінували у ксилолі, доводили крізь спирти до бідистильованої води.

Для видалення можливих залишків катіонів ендogenous цинку їх витримували 5 хв. у 1 % розчині оцтової кислоти [Smith G. L. A fluorescent method for the detection and localization of zinc in human granulocytes / G. L. Smith, R. A. Jenkins, J. F. Gougii // The journal of histochemistry and
45 cytochemistry. - 1969. - V. 17, № 11. -Р. - 749-780], промивали їх у двох змінах бідистильованої води, по 5 хв. у кожній.

Мікропрепарати "нульового" контролю витримували у бідистильованої воді, а інші - у стандартних розчинах сульфату цинку із розрахунку 5 мікропрепаратів для кожного зі стандартних розчинів та витримували протягом 2, 4, 6, 8 та 10 хв. відповідно. Після інкубування
50 стандартний розчин або дистильовану воду струшували з мікропрепаратів, швидко ополіскували їх дистильованою водою, підсушували 30-60 сек. та флуорохромували селективним до катіонів цинку люмінесцентним аналітичним реагентом (0,1 % розчином 8-меркаптохіноліну гідрохлориду) впродовж 5 хв., ополіскували у двох змінах бідистильованої води по 1 хв. у кожній та замикали у гліцерин під покривні скельця.

55 Вимірювання люмінесценції контрольних мікропрепаратів у 10 випадкових полях зору здійснювали із використанням люмінесцентного мікроскопа (фільтр збуджувального світла зі скла ФС-4 (пропускна здатність 360±40 нм), фільтр збудженого світла зі скла ЖС-18 (пропускна здатність 500±40нм), діхроїчне дзеркало (400 нм), об'єктив х 40, окуляр х 10), поєднаного із компактною цифровою фотокамерою, та програмного забезпечення для аналізу зображень.
60 При побудові калібрувального графіку враховували значення інтенсивності люмінесценції двох

послідовних (за часом інкубації) мікропрепаратів, які мали однакове її значення, оскільки це свідчило про настання дифузійної рівноваги між тканиною клубової кишки та стандартним розчином сульфату цинку.

На основі отриманих даних про інтенсивність люмінесценції та концентрацію катіонів цинку у мікропрепаратах будували калібрувальний графік, для чого по горизонтальній осі відкладали відому концентрацію катіонів цинку у стандартному розчині сульфід цинку (мкМ/літр), а по вертикальній - інтенсивність люмінесценції в умовних одиницях (ум. од.).

На кресл. наведено побудований у такий спосіб калібрувальний графік для визначення концентрації катіонів цинку у клітинах Панета, а також рівняння лінійної регресії, розраховане за допомогою табличного процесору Microsoft Excel.

Дослідні мікропрепарати депарафінували у ксилолі, доводили крізь спирти до бідистильованої води, підсушували протягом 30-60 сек. та флюорохромували селективним до катіонів цинку люмінесцентним аналітичним реагентом (0,1 % розчином 8-меркаптохіноліну гідрохлориду) впродовж 5 хв., ополіскували у двох змінах бідистильованої води по 1 хв. у кожній та замикали у гліцерин під покривні скельця.

Вимірювання люмінесценції дослідних мікропрепаратів у 10 випадкових полях зору здійснювали аналогічно до процедури, описаної вище для контрольних мікропрепаратів. Результати дослідження наведено у табл. 1.

Таблиця 1

Інтенсивність люмінесценції та концентрація катіонів цинку в секреторних гранулах клітин Панета щурів ($M \pm SD$)

Дослідна тварина	Інтенсивність люмінесценції, ум. од.	Концентрація цинку, мкМ/л
1	143,4±4,06	158,6±9,03
2	125,4±5,44	118,6±12,10
3	138,0±7,35	146,6±16,35
4	130,2±9,76	129,3±21,72
5	157,3±9,65	189,6±21,47
6	123,9±7,69	115,3±17,12
Середнє значення по вибірці	136,4±12,68	143,0±28,21

За отриманими значеннями інтенсивності люмінесценції мікропрепаратів дослідних зразків тканини клубової кишки та за допомогою, побудованого раніше калібрувального графіку, визначали концентрацію катіонів цинку в клітинах Панета щурів.

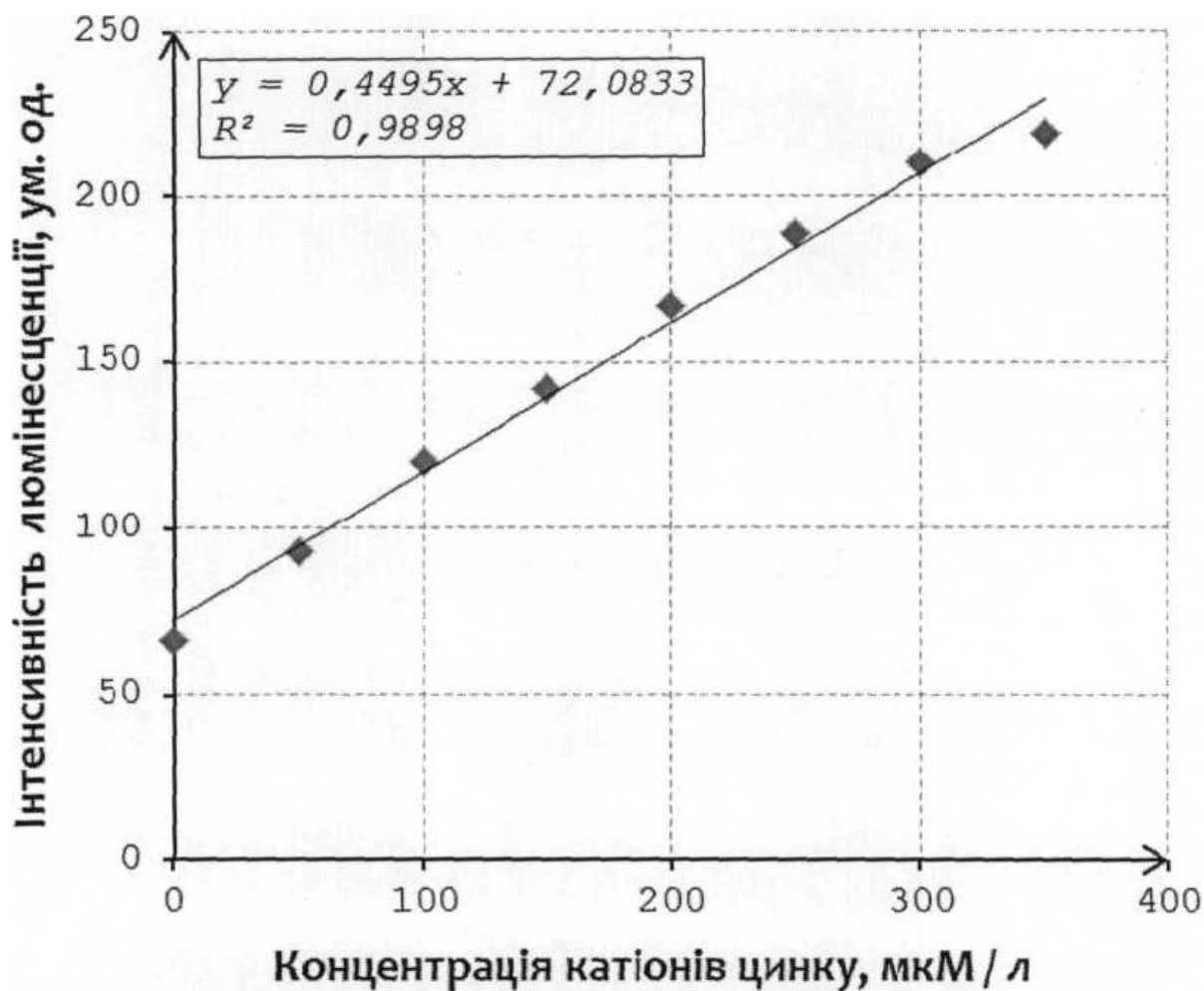
Так, значення інтенсивності люмінесценції у досліджених тварин у середньому дорівнювало 136,4±12,68 ум. од., а концентрація катіонів цинку становила 143,0±28,21 мкМ/л відповідно.

Отже, запропонований спосіб дозволяє здійснювати кількісне визначення катіонів цинку у мікропрепаратах зразків біологічного матеріалу на тканинному та клітинному рівнях. Він є селективним, стабільним та більш точним за існуючі аналоги. Спосіб не потребує використання складного обладнання, та може бути використаний для вирішення широкого кола завдань, у тому числі, лабораторній діагностиці ряду захворювань, які супроводжуються порушенням обміну цього мікроелементу.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

Спосіб визначення катіонів цинку в біологічному матеріалі, який включає взяття зразка біологічного матеріалу, фіксування зразка в фіксувальній рідині, яка містить осаджувач катіонів цинку, виготовлення мікропрепаратів, забарвлення мікропрепаратів флюорохромним аналітичним реагентом на катіони цинку, промивання їх у бідистильованій воді, замикання у нефлуоресцентне середовище під покривні скельця, визначення інтенсивності люмінесцентної реакції аналітичного реагенту з катіонами цинку, побудову калібрувального графіку, визначення концентрації катіонів цинку в клітинах, який **відрізняється** тим, що як осаджувач катіонів цинку використовують сульфід лужних металів або сульфід амонію, або тіосульфат, або тіоацетамід, або тіоформамід, виконують розподілення зразка біологічного матеріалу на контрольний та дослідний зразки, фіксують контрольний зразок у фіксувальній рідині, виготовляють з нього мікропрепарати, з яких видаляють ендогенний цинк, розподіляють їх на декілька груп, витримують мікропрепарати "нульового" контрольного зразка у бідистильованій воді, а інші мікропрепарати контрольного зразка - у стандартних розчинах солі цинку, забарвлюють їх

флуорохромним аналітичним реагентом на катіони цинку, промивають у бідистильованій воді та замикають у нефлуоресцентне середовище під покривні скельця, вимірюють інтенсивність їх люмінесценції, за значеннями якої будують калібрувальний графік, за яким визначають концентрацію катіонів цинку в біологічному матеріалі.



Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

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