

Корисна модель належить до досліджування або аналізування матеріалів шляхом визначання їх хімічних або фізичних властивостей та може бути використана для визначення електроморф гіалуронової кислоти або препаратів, що містять гіалуронову кислоту у медичних і косметичних галузях.

Гіалуронова кислота (ГК) - мукополісахарид, що складається з залишків глюкуронової кислоти та N-ацетилглюкозаміну, поєднаних  $\beta$ -1,3' - зв'язками. ГК - несольфатований глікозаміногліканом, що входить до складу сполучної, епітеліальної і нервової тканин та є однією з головних компонентів міжклітинного матриксу сполучної тканини хребетних, вона сприяє значною мірою клітинній проліферації, міграції, а також може відігравати певну роль в пухлиноутворенні. Широкий спектр біологічної активності, відсутність антигенності при високій біосумісності з тканинами та середовищем людського організму, можливість цілеспрямованої модифікації властивостей - всі ці фактори зумовили широке застосування різних препаратів та виробів на основі ГК у медицині та косметології, зокрема при лікуванні суглобів, кон'юнктивіту, визначенні безпліддя, у косметологічних процедурах тощо.

Контроль фізико-хімічних властивостей ГК, зокрема молекулярного розміру та електрофоретичної рухливості, має важливе значення для забезпечення якості та ефективності застосування препаратів. При використанні ГК має значення розмір молекули. Так, при приготуванні офтальмологічних препаратів перевага надається фракціям ГК більшого розміру. Визначення розміру ГК проводиться або методом паперової хроматографії, або шляхом фільтрації через мікропори з маркерами молекулярного розміру. Дані методики є тривалими у часі та затратними, тому питання визначення розміру гіалуронової кислоти маловитратним, швидким та високоякісним способом є актуальним.

Відомий спосіб аналізу гіалуронової кислоти за Патентом US20040175769A1 (G01N 33/5308, дата публ. 09.09.2004), який описує аналіз гіалуронової кислоти за допомогою зв'язування гіалуронової кислоти з міченими білками та подальше вимірювання, де розділення композиції здійснюється за допомогою електрофорезу. Цей спосіб дозволяє точніше та простіше визначати гіалуронову кислоту, надає можливість кількісного аналізу, але має високу вартість реагентів та потребує стандартизації.

Відомим є спосіб електрофоретичного розподілу у поліакриламідному гелі (ПААГ), який зазвичай використовується для білків та нуклеїнових кислот. Електрофоретична рухливість залежить від розміру молекули, таким чином, після електрофоретичного розподілу можливо визначити розмір молекул відносно молекул відомого розміру.

При використанні методу гелі-електрофорезу суміш молекул пропускається через гелі, який являє собою молекулярне сито. Рушійну силу задає електричне поле, тому молекули мають бути заряджені. Досліджуваний препарат вносять в лунку, розміщену в гелі - середовищі з сітчасто-просторовою структурою. Зазвичай для гелі-електрофорезу використовують тонкі пластини гелю. Знаходячись в буферному розчині, макромолекули мають певний сумарний електричний заряд, і коли через гелі проходить електричний струм, вони переміщуються в електричному полі. Молекули однакового розміру (однакового заряду) рухаються єдиним фронтом, створюючи в гелі дискретні невидимі смуги. Чим менший розмір молекул або більший їхній заряд, тим швидше вони рухаються. Поступово вихідний препарат, що складається з різних макромолекул, розділяється на зони, розподілені по довжині пластинки. За ходом електрофорезу слідкують за переміщенням в гелі фарбника - електрично зарядженої низькомолекулярної речовини, яку вносять в кожну лунку разом із досліджуваною рідиною перед початком електрофорезу. Коли фарбник досягає кінця пластини, електрофорез зупиняють. Якщо зразок являє собою дискретний набір макромолекул різного розміру, то після електрофорезу виходить набір чітких смуг, розміщених одна під одною.

За найближчий аналог було вибрано спосіб визначення розміру ГК за допомогою газозфазного електрофоретичного молекулярного аналізу рухливості (GEMMA), який використовує електрофоретичну рухливість молекул у повітрі для оцінки молекулярної маси аналіту (Linus Malm, Urban Hellman, Göran Larsson, Size determination of hyaluronan using a gas-phase electrophoretic mobility molecular analysis, *Glycobiology*, Volume 22, Issue 1, January 2012, Pages 7-11, джерело - <https://doi.org/10.1093/glycob/cwr096>). Електрофорез проводиться у агарозному гелі, який має меншу роздільну можливість і, внаслідок цього, меншу точність визначення електроморф, а також не може зберігатись тривалий час - що призводить до труднощів при необхідності наведення доказів щодо проведення експерименту. При цьому візуалізація проводиться бромистим етидієм, який є канцерогеном.

Недоліком найближчого аналога є висока вартість реалізації способу, потреба у спеціалізованому обладнанні, відсутність матеріальних доказів проведення експерименту, тобто відсутність візуалізації.

В основу корисної моделі поставлена задача розробки доступного та відтворюваного способу аналітичного контролю, що дозволяє визначати електрофоретичну поведінку гіалуронової кислоти у стандартних умовах, використовуючи гелі-електрофорез з подальшою візуалізацією результатів.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі визначення електроморф гіалуронової кислоти (ГК) методом гелі-електрофорезу з подальшою візуалізацією, що включає виготовлення розчину ГК, проведення гелі-електрофорезу, візуалізацію розчину ГК та визначення електроморф ГК, згідно з корисною моделлю, електрофоретичний розподіл розчину ГК проводять у 10 % поліакриламідному

гелі (ПААГ) в 1×TBE-буфері (89 mM Tris-HCl, pH 8,2; 89 mM борна кислота; 2 mM Na<sub>3</sub>EDTA) при постійній напрузі 500 В та температурі 60 °С протягом 2-4 годин у вертикальному гель-електрофорезному апараті; візуалізацію розчину ГК, розділеного в ПААГ, здійснюють шляхом забарвлення AgNO<sub>3</sub> після обробки ПААГ 10 % етанолом, 1 % азотною кислотою, 0,012 М AgNO<sub>3</sub>, з наступним проявленням у 0,28 М Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> з 0,019 % формаліном та фіксацією в 10 % оцтовій кислоті; визначення електроморф ГК проводять шляхом порівняння з маркером молекулярної ваги LADDER 50 за допомогою програмного забезпечення TotalLab.

Згідно з корисною моделлю, розчин ГК виготовляють шляхом багатоступеневого розведення у дистильованій воді до концентрації 0,0001 %.

Згідно з корисною моделлю, перед нанесенням речовин у ПААГ проводять префорез при напрузі 300 В протягом 30 хв при температурі 60 °С.

Згідно з корисною моделлю, до розчину ГК для нанесення додають буфер, що містить 0,25 % бромфенолового синього, 40 % (в/о) цукрози у воді.

Згідно з корисною моделлю, що електрофоретично нейтральний фарбник вводиться як негативний контроль.

Технічний результат запропонованої корисної моделі вбачається в підвищенні точності визначення розміру електроморф ГК, зменшенні токсичності процедури, можливості візуалізації результатів за допомогою гелевої платинки, яка може слугувати доказом проведення експерименту та використовуватись у подальших дослідженнях.

Запропонований спосіб реалізується наступним чином.

Розчин ГК виготовляють шляхом багатоступеневого розведення у дистильованій воді до концентрації 0,0001 %.

Розподіл розчину ГК та ГК-вмісних препаратів проводиться у 10 % поліакриламідному гелі в 1x TBE-буфері (89 mM Tris-HCl (pH 8,2), 89 mM борна кислота; 2 mM Na<sub>3</sub>EDTA) при постійній напрузі 500 В і температурі 60 °С 2-4 год. залежно від розмірів фрагментів ампліфікації, в апараті для вертикального гель-електрофорезу ("Система вертикального електрофорезу DYCZ-22A"). У гель наноситься по 5 мкл розчинів ГК та ГК вмісних препаратів, маркер молекулярної ваги LADDER 50 (для визначення електрофоретичної рухливості розчину ГК) змішані з 2 мкл буфера для нанесення (0,25 % (в/о) бромфеноловий синій, 40 % (в/о) цукроза у воді) та водний розчин електрофоретично-нейтрального фарбника у якості негативного контролю. Перед нанесенням речовин в гель проводиться префорез протягом 30 хв при постійній напрузі 300 В і температурі 60 °С.

Візуалізація розчину ГК, розділеного в ПААГ, проводиться AgNO<sub>3</sub> (специфічно до органічних сполук). Пластина ПААГ промивається деіонізованою водою 1 хв і проводиться фіксація ДНК 10,0 % етанолом протягом 10 хв. Пластина переноситься в 1,0 % азотну кислоту на 6 хв і промивається 3 рази деіонізованою водою при безперервному струшуванні. Препарати не містять органічних сполук, крім ГК, що унеможливорює псевдопозитивні результати при фарбуванні. Пластина поміщається на 30 хв в 0,012 М AgNO<sub>3</sub> в темряві. Пластина промивається двічі деіонізованою водою при інтенсивному струшуванні. Інкубується пластина у поновлюючому розчині (0,28 М Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,019 % формалін), при заміні розчинів після кожного потемніння, до появи фарбування фрагментів ампліфікації. Пластина фіксується у 10,0 % оцтової кислоті 5 хв. Гель промивається 2 хв деіонізованою водою і зберігається між двома листами прозорої поліетиленової плівки. Всі застосовані реактиви не є канцерогенами.

Визначення електрофоретичної рухливості ГК проводиться за маркером молекулярної ваги LADDER 50 за допомогою програми TotalLab.

При реалізації та дослідженні запропонованого способу використовувались розчини ГК у дистильованій воді та ГК-вмісні препарати "Оксіал" (містить 15 % ГК), "Синокром" (містить 1 % розчинного в воді гіалуронату натрію), "Суплазин" (містить 1 % гіалуронату натрію), "Гіалган" (містить 2 % гіалуронату натрію), "Сингіал" (містить 1 % ГК) у концентрації ГК 0,0001 %.

Результати дослідження наведені у таблиці та на кресленні.

| Розчин   |  |
|----------|--|
| ГК       |  |
| Оксіал   |  |
| Синокром |  |
| Суплазин |  |
| Гіалган  |  |
| Сингіал  |  |

