



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 162680

(13) U

(51) МПК

G01N 27/447 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2025 01892	(72) Винахідник(и): Венгер Ольга Олександрівна (UA), Ославський Денис Олександрович (UA)
(22) Дата подання заявки: 25.04.2025	(73) Володілець (володільці): Венгер Ольга Олександрівна, вул. Армійська, буд. 7, кв. 17, м. Одеса, 65058 (UA), Ославський Денис Олександрович, вул. Новосельського, буд. 66, кв. 5, м. Одеса, 65023 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 16.04.2026	(74) Представник: Івченко Олег Андрійович
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 15.04.2026, Бюл.№ 15	

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ЕЛЕКТРОМОРФ ГІАЛУРОНОВОЇ КИСЛОТИ МЕТОДОМ ГЕЛЬ-ЕЛЕКТРОФЕРЕЗУ З ПОДАЛЬШОЮ ВІЗУАЛІЗАЦІЄЮ**(57) Реферат:**

Спосіб визначення електроморф гіалуронової кислоти (ГК) методом гель-електрофорезу з подальшою візуалізацією включає виготовлення розчину ГК, проведення гель-електрофорезу, візуалізацію розчину ГК та визначення електроморф ГК. Електрофоретичний розподіл розчину ГК проводять у 10 % поліакриламідному гелі (ПААГ) в 1×TBE-буфері, який складається з 89 mM Tris-HCl, pH 8,2; 89 mM борної кислоти та 2 mM Na₃EDTA, при постійній напрузі 500 В та температурі 60 °С протягом 2-4 годин у вертикальному гель-електрофорезному апараті. При цьому у гель наноситься по 5 мкл розчинів ГК та ГК вмісних препаратів, маркер молекулярної ваги, змішані з 2 мкл буфера для нанесення, та водний розчин електрофоретично-нейтрального фарбника, візуалізацію розчину ГК, розділеного в ПААГ, здійснюють шляхом забарвлення AgNO₃ після обробки ПААГ 10 % етанолом, 1 % азотною кислотою, 0,012 М AgNO₃, з наступним проявленням у 0,28 М Na₂CO₃ з 0,019 % формаліном та фіксацією в 10 % оцтовій кислоті, визначення електроморф ГК проводять шляхом порівняння з маркером молекулярної ваги за допомогою програмного забезпечення.

UA 162680 U

UA 162680 U

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 β -1,3' - зв'язками. ГК - нессульфатований 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 мікопори 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 гель-електрофорезу суміш молекул пропускається через гель, 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 гель-електрофорезу використовують тонкі пластини гелю. Знаходячись в буферному розчині, макромолекули мають певний сумарний електричний заряд, і коли через гель 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 газофазного 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 гель-електрофорез з подальшою візуалізацією результатів.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі визначення електроморф гіалуронової кислоти (ГК) методом гель-електрофорезу з подальшою візуалізацією, що включає виготовлення розчину ГК, проведення гель-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 Na₃EDTA) 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 AgNO₃ після обробки ПААГ 10 % етанолом, 1 % азотною кислотою, 0,012 М AgNO₃, з наступним проявленням у 0,28 М Na₂CO₃ 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 платсинки, 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 1х TBE-буфері (89 mM Tris-HCl (pH 8,2), 89 mM борна кислота; 2 mM Na₃EDTA) 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) бромфенолової синь, 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 AgNO₃ (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 унеможливує псевдопозитивні результати при фарбуванні. Пластина поміщається на 30 хв в 0,012 М AgNO₃ в темряві. Пластина промивається двічі деіонізованою водою при інтенсивному струшуванні. Інкубується пластина у поновлюючому розчині (0,28 М Na₂CO₃, 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), "Синокрон" (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.

Таблиця

Розчин	Еквівалент/пара нуклеотидів
ГК	1752, 1850
Оксіал	1745, 1841
Синокрот	1650
Суплазин	1456, 1643
Гіалган	1656, 1703
Сингіал	1767

В Таблиці наведена електрофоретична рухливість розчинів ГК, еквівалент/пара нуклеотидів.

На кресленні зображена схема розподілу розчинів ГК та ГК-вмісних препаратів у ПААГ, де 1 - розчин ГК; 2 - "Оксіал"; 3 - "Синокрот"; 4 - "Суплазин"; 5 - "Гіалган"; 6 - "Сингіал"; 7 - контроль; 8 - маркер молекулярної ваги LADDER 50; S - шкала розподілу нуклеотидних послідовностей (пара нуклеотидів).

За результатами досліджень показано можливість електрофоретичного розподілу ГК у ПААГ з подальшою візуалізацією. Визначено фракції різної довжини у розчинах ГК та ГК-вмісних препаратах, визначено їх розмір один відносно одного та маркера молекулярної ваги. Показано, що препарати "Оксіал", "Суплазин", "Гіалган" мають у своєму складі фракції ГК різного розміру.

Використання електрофоретичного розподілу дозволяє виявити електрофоретичну рухливість ГК та порівняти довжину різних фракцій ГК один відносно одного та маркера молекулярної ваги.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

1. Спосіб визначення електроморф гіалуронової кислоти (ГК) методом гель-електрофорезу з подальшою візуалізацією, що включає виготовлення розчину ГК, проведення гель-електрофорезу, візуалізацію розчину ГК та визначення електроморф ГК, який **відрізняється** тим, що електрофоретичний розподіл розчину ГК проводять у 10 % поліакриламідному гелі (ПААГ) в 1×TBE-буфері, який складається з 89 mM Tris-HCl, pH 8,2, 89 mM борної кислоти та 2 mM Na₂EDTA, при постійній напрузі 500 В та температурі 60 °С протягом 2-4 годин у вертикальному гель-електрофорезному апараті, при цьому у гель наноситься по 5 мкл розчинів ГК та ГК-вмісних препаратів, маркер молекулярної ваги, змішані з 2 мкл буфера для нанесення, та водний розчин електрофоретично-нейтрального фарбника, візуалізацію розчину ГК, розділеного в ПААГ, здійснюють шляхом забарвлення AgNO₃ після обробки ПААГ 10 % етанолом, 1 % азотною кислотою, 0,012 M AgNO₃, з наступним проявленням у 0,28 M Na₂CO₃ з 0,019 % формаліном та фіксацією в 10 % оцтовій кислоті, визначення електроморф ГК проводять шляхом порівняння з маркером молекулярної ваги за допомогою програмного забезпечення.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що розчин ГК виготовляють шляхом багатоступеневого розведення ГК у дистильованій воді до концентрації 0,0001 %.

3. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що перед нанесенням речовин у ПААГ проводять префорез при напрузі 300 В протягом 30 хв при температурі 60 °С.

4. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що буфер для нанесення містить 0,25 % бромфенолового синього, 40 % (в/о) цукрози у воді.

5. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що електрофоретично нейтральний фарбник вводять як негативний контроль.

