



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) UA

(11) 87884

(13) U

(51) МПК

G01N 30/22 (2006.01)

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2013 10024**

(22) Дата подання заявки: **12.08.2013**

(24) Дата, з якої є чинними  
права на корисну  
модель: **25.02.2014**

(46) Публікація відомостей **25.02.2014, Бюл.№ 4**  
про видачу патенту:

(72) Винахідник(и):

**Заїчко Наталія Валентинівна (UA),  
Ольховський Олександр Сергійович  
(UA),  
Юрченко Петро Олександрович (UA),  
Мельник Андрій Володимирович (UA),  
Штатько Олена Іванівна (UA)**

(73) Власник(и):

**НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ ІНСТИТУТ  
РЕАБІЛІТАЦІЇ ІНВАЛІДІВ (НАВЧАЛЬНО-  
НАУКОВО-ЛІКУВАЛЬНИЙ КОМПЛЕКС)  
ВІННИЦЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОГО  
МЕДИЧНОГО УНІВЕРСИТЕТУ ІМ. М.І.  
ПИРОГОВА,  
Хмельницьке шосе, 104, м. Вінниця, 21100  
(UA)**

## (54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ УТИЛІЗАЦІЇ ГІДРОГЕНСУЛЬФІДУ В ОРГАНАХ ТВАРИН

(57) Реферат:

Спосіб визначення утилізації гідрогенсульфіду в органах тварин включає приготування інкубаційної суміші, що містить буфер з оптимальним значенням рН, додавання гомогенатів тканин до інкубаційної суміші, інкубацію при 37 °С, зупинку реакції охолодженням, зв'язування сульфід-аніону додаванням розчину ацетату цинку, визначення кількості сульфід-аніону спектрофотометричним методом за утворенням барвника метиленового синього в реакції з N,N-диметил-пара-фенілендіаміном в присутності іонів заліза. При цьому до інкубаційного середовища додають як субстрат донор  $H_2S-Na_2S$  і визначають швидкість зниження концентрації сульфід-аніону в середовищі.

UA 87884 U



Корисна модель належить до медицини, зокрема, до біохімії, та призначена для оцінки обміну біологічно-активного метаболіту гідрогенсульфіду ( $H_2S$ ) в органах тварин у нормі та при різних патологічних станах, а також для встановлення здатності фармакологічних засобів впливати на обмін  $H_2S$  в органах тварин.

Спосіб визначення продукції  $H_2S$  в органах тварин є відомим і включає приготування інкубаційних сумішей, які містять субстрати та кофактори ензимів синтезу  $H_2S$ , буферу з оптимальним значенням pH, додавання гомогенатів органів до інкубаційних сумішей, інкубацію при  $37^\circ C$ , зупинку реакції охолодженням, зв'язування сульфід-аніону додаванням розчину ацетату цинку та визначення кількості сульфід-аніону спектрофотометричним методом за утворенням барвника метиленового синього в реакції з N,N-диметил-пара-фенілендіаміном в присутності іонів заліза [Утворення гідроген сульфід у органах щурів / Н.В. Заїчко, Н.О. Пентюк, А.В. Мельник, О.І. Штатко, І.І. Андрушко // Медична хімія. - 2009. - Т.11, №4. - С 7-13; пат. України на корисну модель № 45018 U, МПК (2009) G01N 33/00. Спосіб визначення продукції гідроген сульфід у органах тварин / Заїчко Н.В., Пентюк Н.О., Мельник А.В., Штатко О.І.; № 200904434; заявл. 05.05.2009; опубл. 26.10.2009; бюл. № 20. - 2 с.]

Недоліком цього способу є те, що він призначений для оцінки продукції  $H_2S$  з сірковмісних амінокислот і не враховує здатність тканин споживати екзогенний та ендогенний  $H_2S$ . Тому застосуванням відомого способу не вдається комплексно оцінити вплив фізіологічних та патологічних чинників, а також фармакологічних засобів на обмін  $H_2S$  в тканинах. В той же час, розробка методу визначення утилізації  $H_2S$  в органах щурів дозволить встановити нові біохімічні механізми формування різних патологічних станів, визначити ефективність лікарських засобів - донорів  $H_2S$  та розробити нові шляхи фармакотерапії, спрямовані на корекцію обміну  $H_2S$ .

В основу корисної моделі поставлена задача розробити спосіб визначення утилізації  $H_2S$  в органах експериментальних тварин, який давав би можливість оцінити швидкість споживання екзогенного  $H_2S$  різними тканинами.

Поставлена задача вирішується тим, що до інкубаційного середовища, яке містить буфер з оптимальним значенням pH замість субстратів та коферментів ензимів синтезу  $H_2S$ , додають як субстрат донор  $H_2S-Na_2S$  і визначають швидкість зниження концентрації сульфід-аніону в середовищі в присутності гомогенатів тканин тварин спектрофотометричним методом за утворенням метиленового синього в реакції з N,N-диметил-пара-фенілендіаміном в присутності іонів заліза.

Застосування способу.

З метою дослідження утилізації  $H_2S$  в тканинах тварин готують інкубаційне середовище, яке містить донор  $H_2S - 0,312 \text{ mM } Na_2S$ ,  $0,47 \text{ mM } \text{Tris-HCl}$  буфер (pH 7,4), додають постядерний супернатант гомогенату тканин, інкубують при  $37^\circ C$  в стерильних герметизованих пластикових пробірках. Реакцію зупиняють охолодженням пробірок на льоду, додають 1 % розчин ацетату цинку і визначають концентрацію сульфід-аніону в середовищі спектрофотометричним методом за утворенням метиленового синього в реакції з N,N-диметил-пара-фенілендіаміном в присутності іонів заліза.

Конкретний приклад застосування способу.

Для дослідження беруть білого лабораторного щура-самця (№ 1) масою 220 г, проводять евтаназію шляхом дислокації шийних хребців, виділяють органи тварини, промивають їх охолодженим ізотонічним 1,15 % розчином калію хлориду. Наважки тканин подрібнюють ножицями, гомогенізують при 3000 об./хв. (тефлон-скло) для печінки та нирок в середовищі 1,15 % розчину калію хлориду, для міокарду, аорти, мозку - в середовищі 0,25 M сахарози, 0,01 M Трис (pH 7,4) у співвідношенні 1:5 (маса/об'єм). Гомогенати центрифугують 30 хв. при 600 g, відбирають аліквоти постядерного супернатанту в мікропробірки Eppendorf. Всі процедури проводять при температурі  $4-6^\circ C$ . До 1,0 мл інкубаційного середовища, що містить 312 мкМ  $Na_2S$ , 0,47 мМ  $\text{Tris-HCl}$  буферу (pH 7,4) в кінцевих концентраціях, додають 0,1 мл постядерного супернатанту гомогенату тканини (кількість білка - 1-2 мг), інкубують 30 хв. при  $37^\circ C$  в стерильних герметизованих пластикових пробірках типу Eppendorf. Контрольні проби інкубують без гомогенату, який додають лише після зупинки реакції. Дослідження проводять в трьох паралельних пробах. Реакцію зупиняють охолодженням пробірок на льоду, після чого додають 0,5 мл 1 % розчину ацетату цинку для зв'язування сульфід-аніону, 0,5 мл 20 мМ розчину N,N-диметил-пара-фенілендіаміну в 7,2 M HCl, 0,4 мл 30 мМ розчину  $FeCl_3$  на 1,2 M HCl. Пробірки витримують 20 хв. при  $18-25^\circ C$ , потім додають 1 мл 20 % трихлороцтової кислоти, центрифугують 10 хв. при 1500 g. Вимірюють абсорбцію надосадової рідини на фотометричному обладнанні при довжині хвилі 670 нм. Швидкість утилізації  $H_2S$  визначають за зниженням концентрації сульфід-аніону в інкубаційному середовищі, яку розраховують за

калібрувальним графіком. Стандартом є водні розчини  $\text{Na}_2\text{S} \times 9\text{H}_2\text{O}$  з концентраціями 31,2-3120 мкМ, які обробляють як дослідні проби. Результати наведені в таблиці.

Таблиця

Конкретний приклад застосування способу визначення утилізації  $\text{H}_2\text{S}$  в тканинах щура ( $M \pm m$ ,  $n=3$ )

Тканина	$A_1$ (абсорбція контролю)	$A_2$ (абсорбція досліді)	$A_1 - A_2$	% зниження за 30 хв.	Швидкість утилізації $\text{H}_2\text{S}$ , нмоль /хв·мг протеїну
Міокард	$0,285 \pm 0,003$	$0,152 \pm 0,003$	$0,133 \pm 0,002$	46,7	$0,682 \pm 0,007$
Нирки	$0,170 \pm 0,001$	$0,040 \pm 0,004$	$0,130 \pm 0,005$	76,4	$0,669 \pm 0,021$
Печінка	$0,371 \pm 0,008$	$0,085 \pm 0,005$	$0,286 \pm 0,005$	77,1	$1,46 \pm 0,016$
Мозок	$0,145 \pm 0,005$	$0,088 \pm 0,002$	$0,057 \pm 0,005$	39,3	$0,294 \pm 0,026$
Калібрувальна проба, 312 мкМ $\text{H}_2\text{S}$	$0,352 \pm 0,002$	$0,337 \pm 0,004$	$0,015 \pm 0,002$	3,31	-

- 5 Таким чином, запропонований спосіб визначення утилізації  $\text{H}_2\text{S}$  в тканинах тварин є простим у виконанні і дозволяє оцінити здатність різних органів метаболізувати екзогенний  $\text{H}_2\text{S}$ .

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 10 Спосіб визначення утилізації гідрогенсульфіду в органах тварин, який включає приготування інкубаційної суміші, що містить буфер з оптимальним значенням рН, додавання гомогенатів тканин до інкубаційної суміші, інкубацію при 37 °С, зупинку реакції охолодженням, зв'язування сульфід-аніону додаванням розчину ацетату цинку, визначення кількості сульфід-аніону спектрофотометричним методом за утворенням барвника метиленового синього в реакції з N,N-диметил-пара-фенілендіаміном в присутності іонів заліза, який **відрізняється** тим, що до інкубаційного середовища додають як субстрат донор  $\text{H}_2\text{S}$ - $\text{Na}_2\text{S}$  і визначають швидкість зниження концентрації сульфід-аніону в середовищі.

---

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

---

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