



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) UA

(11) 75683

(13) U

(51) МПК

G01N 30/22 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2012 06388**

(22) Дата подання заявки: **28.05.2012**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **10.12.2012**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **10.12.2012, Бюл.№ 23**

(72) Винахідник(и):

**Заїчко Наталія Валентинівна (UA),
Мельник Андрій Володимирович (UA),
Ольховський Олександр Сергійович
(UA),
Заїчко Катерина Олександрівна (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 H₂S-ПРОДУКУЮЧОЇ АКТИВНОСТІ МІОКАРДА ТВАРИН

(57) Реферат:

Спосіб визначення H₂S-продукуючої активності міокарда тварин включає приготування інкубаційних сумішей, буферу з оптимальним значенням рН, додавання гомогенатів міокарда до інкубаційних середовищ, інкубацію, зупинку реакції охолодженням, зв'язування сульфід-аніону додаванням розчину ацетату цинку, визначення кількості сульфід-аніону, модифікування базового інкубаційного середовища, визначення продукції H₂S з сірковмісних амінокислот та з неорганічних аніонів сірки, розрахунок загальної H₂S-продукуючої активності міокарда.

UA 75683 U

Спосіб визначення H_2S -продукуючої активності міокарда тварин належить до медицини, зокрема до біохімії. Він призначений для оцінки продукції гідроген сульфід (H_2S) в міокарді у нормі та при різних патологічних станах, а також для встановлення здатності фармакологічних засобів коригувати зміни H_2S -синтезуючої активності міокарда тварин.

Спосіб визначення продукції H_2S в печінці та нирках тварин є відомим і включає приготування інкубаційних сумішей, які містять субстрати, косубстрати та кофактори різних H_2S -продукуючих ензимів (цистеїн, гомоцистеїн, альфа-кетоглутарат, піридоксальфосфат), буферу з оптимальним значенням pH, додавання гомогенатів органів до інкубаційних сумішей, інкубацію при 37 °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 [див. Утворення гідроген сульфід в 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 в органах тварин / Заїчко Н.В., Пентюк Н.О., Мельник А.В., Штатко О.І.; № u200904434; заявл. 05.05.2009; опубл. 26.10.2009; Бюл. № 20.- 2 с.].

Недоліками цього способу є те, що він призначений для оцінки продукції H_2S з сірковмісних амінокислот у паренхіматозних органах і не враховує внесок в продукцію H_2S альтернативного метаболічного шляху синтезу H_2S з тіосульфат-аніону (за участі тіосульфатдитіолсульфідтрансферази). Тому застосуванням відомого способу не вдається визначити загальну H_2S -продукуючу активність міокарда та порівняти внесок шляхів синтезу H_2S з сірковмісних амінокислот (за рахунок десульфуровування цистеїну, конденсації цистеїну з гомоцистеїном, переамінування цистеїну з альфа-кетоглутаратом) та з неорганічних аніонів сірки (зокрема, тіосульфат-аніону). В той же час, розробка методу визначення H_2S -продукуючої здатності міокарда дозволить поглибити розуміння біохімічних механізмів формування патології серця та розробити нові шляхи фармакотерапії серцево-судинних захворювань, спрямованих на корекцію того чи іншого метаболічного шляху утворення H_2S .

В основу корисної моделі "Спосіб визначення H_2S -продукуючої активності міокарда тварин" поставлена задача розробити спосіб визначення продукції H_2S в міокарді експериментальних тварин, який давав би можливість оцінити не лише утворення H_2S з сірковмісних амінокислот, а й з тіосульфат-аніону, порівняти внесок кожного з метаболічних шляхів в цей процес та встановити загальну H_2S -продукуючу активність міокарда.

Поставлена задача вирішується тим, що до інкубаційного середовища 1, яке містить субстрат цистеїн, кофактор піридоксальфосфат та трис-буфер, додають косубстрати гомоцистеїн (середовище 2) або альфа-кетоглутарат (середовище 3), а у середовище 4 додають тіосульфат-аніон та дитіотреїтол замість цистеїну та піридоксальфосфату, визначають продукцію H_2S в міокарді при одночасному використанні чотирьох інкубаційних середовищ та отримують дані щодо швидкості утворення H_2S в реакціях: 1) десульфуровування цистеїну (середовище 1), 2) конденсації цистеїну та гомоцистеїну (середовище 2), 3) трансамінування цистеїну з альфа-кетоглутаратом (середовище 3), 4) відновлення тіосульфату (середовище 4).

Застосування способу. З метою дослідження продукції H_2S в міокарді тварин готують інкубаційне середовище 1, яке містить L-цистеїн 6,0 мМ, піридоксальфосфат 1,34 мМ, трис-буфер 0,08 М (pH 8,5) в кінцевих концентраціях, ділять його на три частини і до одної частини додають D, L-гомоцистеїн в кінцевій концентрації 6,0 мМ (середовище 2), до другої частини додають альфа-кетоглутарат в кінцевій концентрації 1,6 мМ (середовище 3). Середовище 4 містить трис-буфер 0,08 М (pH 8,5), тіосульфат натрію 0,2 мМ, дитіотреїтол 2,3 мМ. В пробірки вносять інкубаційні середовища 1, 2, 3, 4 додають гомогенат міокарда, для попередження втрат H_2S пробірки закривають плівкою "Parafilm" та інкубують при 37 °C. Контрольні проби інкубують без гомогенату, який додають лише після зупинки реакції. Зупиняють реакцію охолодженням пробірок на льоду, після чого додають 1 % розчин ацетату цинку для зв'язування сульфід-аніону, 20 мМ розчин N,N-диметил-пара-фенілендіаміну в 7,2М HCl, 30 мМ розчин $FeCl_3$ на 1,2М HCl. Пробірки витримують 20 хв. при 18-25 °C, потім додають 20 % трихлороцтову кислоту, центрифугують 10 хв. при 1500 g. Вимірюють величину абсорбції надосадової рідини на фотометричному обладнанні при довжині хвилі 670 нм проти контрольної проби, яку обробляють як дослідні проби за винятком того, що гомогенат вносять в середовище після інкубації та охолодження. Продукція H_2S при використанні середовища 1 відбувається за рахунок десульфуровування цистеїну (результат 1), середовища 2 - за рахунок десульфуровування цистеїну та гомоцистеїну (результат 2), середовища 3 - за рахунок десульфуровування та переамінування цистеїну (результат 3), середовища 4 - за рахунок відновлення тіосульфат-аніону (результат 4). Продукція H_2S за рахунок конденсації цистеїну з гомоцистеїном

визначається шляхом віднімання від результату 2 результату 1 (2-1), а за рахунок переамінування цистеїну - шляхом віднімання від результату 3 результату 1 (3-1). Загальна H_2S -продукуюча активність міокарда розраховується як сума результатів 1, (2-1), (3-1) та 4.

Конкретний приклад застосування способу. До 0,5 мл інкубаційних середовищ 1, 2, 3, 4 додали по 0,2 мл постядерного супернатанту гомогенату міокарда (кількість білка - 2 мг), інкубували 60 хв. при $37^\circ C$ в пробірках, закритих плівкою "Parafilm". Контрольні проби інкубували без гомогенату, який додали лише після зупинки реакції. Реакцію зупинили охолодженням пробірок на льоду, після чого додали 0,5 мл 1 % розчину ацетату цинку для зв'язування сульфід-аніону, 0,5 мл 20 мМ розчину N,N-диметил-пара-фенілендіаміну в 7,2M HCl, 0,4 мл 30 мМ розчину $FeCl_3$ на 1,2M HCl. Пробірки витримали 20 хв. при $18-25^\circ C$, потім додали 1 мл 20 % трихлороцтової кислоти, центрифугували 10 хв. при 1500 g. Виміряли абсорбцію надосадової рідини на фотометричному обладнанні при довжині хвилі 670 нм в кюветі з довжиною оптичного шляху 0,5 см проти контрольної проби. Кількість утвореного H_2S розраховували за калібрувальною пробою, в яку замість супернатанту додали 0,1 мл 312 мМ розчину $Na_2S \times 9H_2O$ і обробили як дослідні проби.

Для приготування постядерного супернатанту міокарда одразу після виділення серце перфузували холодним 1,15 % розчином калію хлориду, гомогенізували при 3000 об/хв. (тефлон-скло) в середовищі 1,15 % калію хлориду у співвідношенні 1:4, гомогенат центрифугували при 600 g та $4^\circ C$ упродовж 30 хвилин.

Результати та приклад розрахунку наведені в таблиці.

Таблиця

Конкретний приклад застосування
способу визначення продукції H_2S в міокарді тварини (щура)

| Інкубаційне середовище | Шлях утворення H_2S | Продукція H_2S , нмоль/хв. на 1 мг білка |
|--|--|--|
| Середовище 1 | Десульфуровування цистеїну | 0,23 (результат 1) |
| Середовище 2 | Десульфуровування цистеїну та гомоцистеїну | 0,28 (результат 2) |
| Розрахунок | Конденсація цистеїну з гомоцистеїном | $0,28-0,23=0,05$ |
| Середовище 3 | Десульфуровування цистеїну та його переамінування з альфа-кетоглутаратом | 0,75 (результат 3) |
| Розрахунок | Переамінування цистеїну з альфа-кетоглутаратом | $0,75-0,23=0,52$ |
| Середовище 4 | Відновлення тіосульфату | 1,20 (результат 4) |
| Розрахунок загальної H_2S -продукуючої активності міокарда | | $0,23+0,05+0,52+1,20=2,00$ |

Таким чином, запропонований спосіб визначення продукції H_2S в міокарді тварин є простим у виконанні і дозволяє одночасно визначити внесок різних шляхів в продукцію H_2S з сірковмісних амінокислот та неорганічних аніонів сірки (тіосульфату), а також розрахувати загальну H_2S -продукуючу активність міокарда.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- Спосіб визначення H_2S -продукуючої активності міокарда тварин, який включає приготування інкубаційних сумішей, що містять субстрати, косубстрати та кофактори різних H_2S -продукуючих ензимів (цистеїн, гомоцистеїн, альфа-кетоглутарат, піридоксальфосфат), буферу з оптимальним значенням рН, додавання гомогенатів міокарда до інкубаційних середовищ, 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 базове інкубаційне середовище модифікують включенням тіосульфату та дитіотреїтолу замість цистеїну та піридоксальфосфату і визначають продукцію H_2S з сірковмісних амінокислот та з неорганічних аніонів сірки (за рахунок відновлення тіосульфату), з наступним розрахунком загальної H_2S -продукуючої активності міокарда.

Комп'ютерна верстка Л.Литвиненко

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