



REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **1581** (13) **Y**
(51) Int.Cl: *A61B 10/00* (2006.01)
G01N 33/52 (2006.01)

**(12) BREVET DE INVENȚIE
DE SCURTĂ DURATĂ**

În termen de 6 luni de la data publicării mențiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenție de scurtă durată, orice persoană poate face opoziție la acordarea brevetului	
(21) Nr. depozit: s 2021 0017 (22) Data depozit: 2021.03.12	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2021.12.31, BOPI nr. 12/2021
(71) Solicitant: IP UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD	
(72) Inventatori: PANTEA Valeriana, MD; ANDRONACHE Lilia, MD; SARDARI Veronica, MD; FULGA Ala, MD; ȘVEȚ Inna, MD; GAMANIUC Marina, MD; GHINDA Sergiu, MD; POPA Veaceslav, MD	
(73) Titular: IP UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD	

(54) Metodă de apreciere a influenței substanțelor biologice active asupra capacității de producere a hidrogenului sulfurat de către un țesut biologic**(57) Rezumat:**

1

Invenția se referă la medicină și biochimie și poate fi utilizată pentru selectarea compușilor biologici activi, care influențează asupra producerii hidrogenului sulfurat endogen, aprecierea activității remediilor noi în prevenirea complicațiilor bolilor cardiovasculare și neurodegenerative, diabetului zaharat și altor boli.

Esența invenției constă în aceea că substanțele pentru testare în diferite concentrații se amestecă cu o soluție de 0,05 M de tampon fosfat cu pH-ul 7,4 cu conținut de omogenizat tisular, și anume din țesut hepatic, cu concentrația de 1,0...3,0 mg proteină/mL, care se incubează la temperatura de 37°C, timp de 5...10 min, apoi se adaugă un amestec, care conține o soluție de 0,05 M de tampon fosfat cu pH-ul 7,4, L-cisteină (concentrația finală de 0,8...1,6 mM/L) și piridoxal 5'-fosfat (concentrația finală de 0,08...0,16 mM/L). Probele se acoperă cu un capac, care conține în partea interioară un strat de gel de agaroză, obținut prin amestecarea unei soluții de 1% de agaroză cu o soluție, care conține 0,18 M de tartrat de sodiu și potasiu și 0,08 M de hidroxid

2

de cupru (II), în raport de 4:1, cu pH-ul 9,0...9,7. Probele se incubează la temperatura de 37°C, timp de 2 ore, după care capacul cu gelul de agaroză se introduce în cititorul de plăci și se măsoară absorbanta la lungimea de undă de 320 nm, apoi se calculează capacitatea de producere a hidrogenului sulfurat sub influența substanțelor cercetate după formula:

$$CP (\%) = 100 - [1 - (Apr - Ab) / (Ak - Ab)] * 100,$$

unde:

CP (%) - capacitatea de producere a hidrogenului sulfurat;

Apr - absorbanta probei de cercetat;

Ak - absorbanta probei de control;

Ab - absorbanta probei blank;

în cazul în care capacitatea de producere a hidrogenului sulfurat este mai mare de 100%, substanța cercetată activează capacitatea de producere a hidrogenului sulfurat, iar dacă este mai mică de 100%, substanța cercetată inhibă capacitatea de producere a hidrogenului sulfurat.

Revendicări: 1

(54) Method for assessing the influence of biologically active substances on hydrogen sulphide production capacity by a biological tissue

(57) Abstract:

1

The invention relates to medicine and biochemistry and can be used for selecting biologically active compounds affecting the production of endogenous hydrogen sulfide, assessment of the activity of new agents in the prevention of complications of cardiovascular and neurodegenerative diseases, diabetes mellitus and other diseases.

Summary of the invention consists in that the test substances in various concentrations are mixed with a 0.05 M phosphate buffer solution with the pH 7.4 containing tissue homogenate, namely from liver tissue, with a concentration of 1.0...3.0 mg protein/mL, which are incubated at 37°C for 5...10 min, then is added a mixture, containing 0.05 M phosphate buffer solution with the pH 7.4, L-cysteine (final concentration of 0.8...1.6 mM/L) and pyridoxal-5'-phosphate (final concentration of 0.08...0.16 mM/L). The samples are closed with a cover, containing on the inside a layer of agarose gel, prepared by mixing a 1% agarose solution with a solution, containing 0.18 M sodium and potassium tartrate and 0.08

2

M copper (II) hydroxide, in a ratio of 4:1, with the pH 9.0...9.7. The samples are incubated at 37°C for 2 hours, after which the cover with the agarose gel is introduced into a plate reader and is measured the absorbance at a wavelength of 320 nm, then is calculated the hydrogen sulfide production capacity under the influence of the test substances according to the formula:

$CP (\%) = 100 - [1 - (Apr - Ab) / (Ak - Ab)] * 100$, where:

CP (%) - hydrogen sulfide production capacity;

Apr - absorption of the test sample;

Ak - absorption of the control sample;

Ab - absorption of the blank sample;

in the event if the hydrogen sulfide production capacity exceeds 100%, the test substance activates the hydrogen sulfide production capacity, and if it is less than 100%, the test substance inhibits the hydrogen sulfide production capacity.

Claims: 1

(54) Метод оценки влияния биологически активных веществ на способность выработки сероводорода биологической тканью

(57) Реферат:

1

Изобретение относится к медицине и биохимии и может быть использовано для выбора биологически активных соединений, влияющих на выработку эндогенного сероводорода, оценки активности новых средств в профилактике осложнений сердечно-сосудистых и нейродегенеративных заболеваний, сахарного диабета и других заболеваний.

Сущность изобретения состоит в том, что исследуемые вещества в различных концентрациях смешивают с 0,05 М раствора фосфатного буфера с pH 7,4, содержащим гомогенат из ткани, а именно из ткани печени, с концентрацией 1,0...3,0 мг белка/мл, которые инкубируют при температуре 37°C, в течение 5...10 мин, затем добавляют смесь, которая содержит 0,05 М раствора фосфатного буфера с pH 7,4, L-цистеин (конечная концентрация 0,8...1,6 мМ/л) и пиридоксаль-5'-фосфата (конечная концентрация 0,08...0,16 мМ/л). Пробы закрывают крышкой, содержащей с внутренней стороны слой из агарозного геля, приготовленный смешиванием 1%-го раствора агарозы с раствором,

2

содержащим 0,18 М тартрата натрия и калия и 0,08 М гидроксида меди (II), при соотношении 4:1, с pH 9,0...9,7. Пробы инкубируют при температуре 37°C, в течение 2-х часов, после чего крышку с агарозным гелем вставляют в ридер для пластин и измеряют поглощение при длине волны 320 нм, затем рассчитывают способность выработки сероводорода под воздействием исследуемых веществ по формуле:

$CP (\%) = 100 - [1 - (Apr - Ab) / (Ak - Ab)] * 100$, где:

CP (%) - способность выработки сероводорода;

Apr - поглощение исследуемой пробы;

Ak - поглощение контрольной пробы;

Ab - поглощение холостой пробы;

в случае если способность выработки сероводорода превышает 100%, исследуемое вещество активирует способность выработки сероводорода, а если оно менее 100%, исследуемое вещество ингибирует способность выработки сероводорода.

П. формулы: 1

Descriere:

Invenția se referă la medicină și biochimie și poate fi utilizată pentru selectarea compușilor biologici activi, care influențează asupra producerii hidrogenului sulfurat endogen, aprecierea activității remediilor noi în prevenirea complicațiilor bolilor cardiovasculare și neurodegenerative, diabetului zaharat și altor boli.

Hidrogenul sulfurat (H_2S) este o importantă moleculă de semnalizare care participă în numeroase procese fiziologice și biochimice, iar dereglările biosintezei acestei molecule sunt legate de complicațiile diferitor boli.

Astfel, nivelurile de H_2S sunt scăzute într-o serie de patologii (de exemplu, diabet zaharat, afecțiuni cardiovasculare, ischemie și îmbătrânire) și sunt crescute în alte stări patologice (de exemplu, inflamație, boli severe și cancer) (Xiao Q., Ying J., Xiang L., Zhang C. The biologic effect of hydrogen sulfide and its function in various diseases. *Medicine* (Baltimore), 2018 Nov., vol. 97(44), e13065. doi: 10.1097/MD.00000000000013065).

H_2S este un gaz, produs în celule și țesuturi prin diferite procese enzimatică, în care sunt implicate cel puțin 3 enzime - cistationine gama-liaze sau cistationaze (CSE, EC 4.4.1.1), cistationine- β -sintaze (EC 4.2.1.22) și 3-mercaptopiruvat sulfurtransferaze (3MST, EC.2.8.1.2) (Christopher Hine and James R. Mitchell. Endpoint or Kinetic Measurement of Hydrogen Sulfide Production Capacity in Tissue Extracts. *Bio Protoc.*, 2017 July 5, vol. 7(13), doi: 10.21769/BioProtoc.2382).

În ultimele decenii s-au identificat abordări multiple pentru utilizarea terapeutică a H_2S , fie pe baza donării și intensificării sintezei de H_2S , fie prin inhibarea biosintezei H_2S (Csaba Szabo, Andreas Papapetropoulos. *International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CII: Pharmacological Modulation of H_2S Levels: H_2S Donors and H_2S Biosynthesis Inhibitors. Pharmacol Rev.*, 2017 Oct; vol. 69(4), p. 497-564; Antonia Asimakopoulou,1,* Panagiotis Panopoulos,1, * Christos T Chasapis. Selectivity of commonly used pharmacological inhibitors for cystathionine β synthase (CBS) and cystathionine γ lyase (CSE) *Br J. Pharmacol.*, 2013 Jun; 169(4), p. 922-932).

Prin urmare, activarea sau inhibarea terapeutică a producerii acestui gaz sau menținerea la un nivel fiziologic optimal a biosintezei de H_2S este o contribuție nouă, deoarece substanțele bioactive, care influențează asupra capacității de producere a H_2S endogen pot fi folosite în calitate de remedii pentru prevenirea și medicația diferitor boli.

Pentru a examina noi substanțe cu efecte de stimulare, inhibare sau menținere la un nivel fiziologic optimal a capacității de producere a H_2S endogen sunt necesare metode disponibile pentru selectarea compușilor bioactive, care ar influența asupra biosintezei de H_2S endogen, fapt ce poate aduce beneficii importante sănătății umane.

Sunt cunoscute metodele colorimetrice, electrochimice, fluorimetrice, cromatografice, cum ar fi cromatografia lichidă de înaltă performanță și cromatografia în fază gazoasă, spectrometria de masă pentru măsurarea cantitativă a hidrogenului sulfurat [1].

Dezavantajele metodelor cunoscute constau în faptul că ele sunt costisitoare, economic dezavantajoase, deoarece prevăd utilizarea echipamentelor costisitoare, cum ar fi tehnica specifică pentru fluorimetrie, cromatografie lichidă de înaltă performanță, cromatografie în faza gazoasă, spectrometrie de masă. Un alt neajuns al acestor metode constă în faptul că multe din ele necesită un pretratament chimic cu acizi sau baze tari ale probelor de cercetat, ceea ce poate influența negativ asupra preciziei, reproductibilității acestor metode și uneori conduc la rezultate eronate (fals mărite sau scăzute de H_2S).

Cea mai apropiată după esența tehnică și rezultatul obținut este metoda, care se bazează pe incubarea probei de cercetat cu un producător de hidrogen sulfurat (culturi celulare, omogenat tisular (ficat, rinichi) la care se adaugă un mediu de reacție, care conține soluție de tampon fosfat, L-cisteină și piridoxal 5'-fosfat, iar vaporii de H_2S , care se elimină deasupra probei biologice, sunt captați de către un suport (de exemplu, gel de agaroză), care conține un compus al metalului bivalent - acetatul de plumb cu formarea unui precipitat de sulfură de plumb, cantitatea căruia se măsoară prin spectrofotometrie [2].

Un dezavantaj al metodei menționate constă în utilizarea substanțelor extrem de toxice, cum ar fi acetatul de plumb, care manifestă proprietăți mutagenice, genotoxice, carcinogenice, teratogenice, etc., fapt ce necesită măsuri speciale de precauție și securitate (REGULAMENTUL (CE) NR. 1272/2008 AL PARLAMENTULUI EUROPEAN ȘI AL CONSILIULUI din 16 decembrie 2008 privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și a amestecurilor, de

modificare și de abrogare a Directivelor 67/548/CEE și 1999/45/CE, precum și de modificare a Regulamentului (CE) nr. 1907/2006).

Un alt dezavantaj constă în aceea că ea nu prevede selectarea condițiilor optime de efectuare a reacției enzimaticе, fapt ce influențează negativ asupra reproductibilității și preciziei metodei, productivității muncii și eficienței economice.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în eliminarea dezavantajelor menționate, și anume excluderea utilizării substanțelor extrem de toxice, cum ar fi acetatul de plumb prin substituirea acestuia cu hidroxidul de cupru (II) complexat cu tartrat de sodiu și potasiu.

Hidroxidul de cupru este o substanță puțin toxică, fiind aprobată în diferite țări pentru utilizare largă în agricultură, împotriva bolilor fungice și bacteriene (REGULAMENTUL (CE) NR. 1272/2008 AL PARLAMENTULUI EUROPEAN ȘI AL CONSILIULUI din 16 decembrie 2008 privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și a amestecurilor, de modificare și de abrogare a Directivelor 67/548/CEE și 1999/45/CE, precum și de modificare a Regulamentului (CE) nr. 1907/2006), și totodată care dă posibilitatea de a elabora condiții optime de efectuare a reacțiilor chimice, fapt ce permite de a mări precizia și reproductibilitatea metodei, productivitatea muncii și eficiența economică.

Esența invenției constă în aceea că se pregătesc substanțele pentru testare în diferite concentrații, care se amestecă cu o soluție de 0,05 M de tampon fosfat cu pH-ul 7,4, după care se pregătește omogenizatul tisular, în care se utilizează țesutul hepatic, care se omogenizează timp de 30...60 s cu o soluție de 0,05 M de tampon fosfat cu pH-ul 7,4, care conține o soluție de 1% de 3-[(3-cholamidopropil)dimetilamonio]-1-propanesulfonat hidrat, după care probele se îngheață și se dezgheață la temperatura camerei, timp de 5...10 min, iar procedura de înghețare și dezghețare se repetă de 2 ori, apoi omogenizatul tisular se centrifughează timp de 10 min la temperatura de 4°C și se determină concentrația de proteină în omogenizat; se pregătesc probele de cercetat, de control și probele blank cu utilizarea plăcii fotometrice cu godeuri, în probele de cercetat se pipetează substanța de cercetat în diverse diluții, iar în probele de control se pipetează o soluție de 0,05 M de tampon fosfat cu pH-ul 7,4 și quercetină în calitate de substanță de referință, apoi în ambele probe se adaugă omogenizat tisular pregătit cu o soluție de 0,05 M de tampon fosfat cu pH-ul 7,4, în concentrație de 1,0...3,0 mg proteină/mL, probele blank se montează la fel ca și probele de control, iar omogenizatul tisular se înlocuiește cu soluția de 0,05 M de tampon fosfat cu pH-ul 7,4, care conține o soluție de 1% de 3-[(3-cholamidopropil)dimetilamonio]-1-propanesulfonat hidrat; placa cu probele pregătite se incubează la temperatura de 37°C, timp de 5...10 min, după care în toate godeurile se adaugă un amestec, care conține o soluție de 0,05 M de tampon fosfat cu pH-ul 7,4, 0,2...0,4 μM/L de L-cisteină (concentrația finală de 0,8...1,6 mM/L) și 0,02...0,04 μM/L de piridoxal 5'-fosfat (concentrația finală de 0,08...0,16 mM/L), apoi probele se acoperă cu un capac, care conține în partea interioară un strat de gel de agaroză de 3...5 mm, obținut prin amestecarea unei soluții de 1% de agaroză cu temperatura de 50...55°C cu o soluție, care conține 0,18 M de tartrat de sodiu și potasiu și 0,08 M de hidroxid de cupru (II), în raport de 4:1, cu pH-ul 9,0...9,7. Probele se incubează la temperatura de 37°C, timp de 2 ore, după care capacul cu gelul de agaroză se introduce în cititorul de plăci și se măsoară absorbanta la lungimea de undă de 320 nm, apoi se calculează capacitatea de producere a hidrogenului sulfurat sub influența substanțelor cercetate după formula:

$$CP (\%) = 100 - [1 - (Apr - Ab) / (Ak - Ab)] * 100, \text{ unde:}$$

CP(%) - capacitatea de producere a hidrogenului sulfurat;

Apr - absorbanta probei de cercetat;

Ak - absorbanta probei de control;

Ab - absorbanta probei blank;

în cazul în care capacitatea de producere a hidrogenului sulfurat este mai mare de 100%, substanța cercetată activează capacitatea de producere a hidrogenului sulfurat, iar dacă este mai mică de 100%, substanța cercetată inhibă capacitatea de producere a hidrogenului sulfurat.

Rezultatul tehnic al invenției constă în elaborarea unei metode netoxice, prietenoase mediului ambiant, în mărirea preciziei și reproductibilității, productivității muncii și eficienței economice a metodei de apreciere a influenței substanțelor biologic active asupra capacității de producere a hidrogenului sulfurat, datorită folosirii în calitate de captator al hidrogenului sulfurat a gelului de agaroză, care conține hidroxid de cupru complexat cu tartrat de sodiu și potasiu și excluderii folosirii reactivilor toxici, cum ar fi acetatul de plumb.

Metoda se efectuează în modul următor.

În placa fotometrică cu 96 de godeuri se toarnă câte 15 μL de diluții de lucru ale substanțelor biologic active, care se amestecă cu o soluție de 0,05 M de tampon fosfat cu pH-ul

7,4, după care se pregătește omogenizatul tisular, în care se utilizează țesutul hepatic, care se omogenizează timp de 30...60 s cu o soluție de 0,05 M de tampon fosfat cu pH-ul 7,4, care conține o soluție de 1% de 3-[(3-cholamidopropil)dimetilamonio]-1-propanesulfonat hidrat, după care probele se îngheață și se dezgheață la temperatura camerei, timp de 5...10 min, iar procedura de înghețare și dezghețare se repetă de 2 ori, apoi omogenizatul tisular se centrifughează timp de 10 min la temperatura de 4°C și se determină concentrația de proteină în omogenizat; se pregătesc probele de cercetat, de control și probele blank cu utilizarea plăcii fotometrice cu godeuri, în probele de cercetat se pipetează substanța de cercetat în diverse diluții, iar în probele de control se pipetează o soluție de 0,05 M de tampon fosfat cu pH-ul 7,4 și quercetină în calitate de substanță de referință, apoi în ambele probe se adaugă omogenizat tisular pregătit cu o soluție de 0,05 M de tampon fosfat cu pH-ul 7,4, în concentrație de 1,0...3,0 mg proteină/mL, probele blank se montează la fel ca și probele de control, iar omogenizatul tisular este înlocuit cu soluția de 0,05 M de tampon fosfat cu pH-ul 7,4, care conține o soluție de 1% de 3-[(3-cholamidopropil)dimetilamonio]-1-propanesulfonat hidrat; placa cu probele pregătite se incubează la temperatura de la 37°C, timp de 5...10 min, după care în toate godeurile se adaugă un amestec, care conține o soluție de 0,05 M de tampon fosfat cu pH-ul 7,4, 0,2...0,4 μM/L de L-cisteină (concentrația finală de 0,8...1,6 mM/L) și 0,02...0,04 μM/L de piridoxal 5'-fosfat (concentrația finală de 0,08...0,16 mM/L), apoi probele se acoperă cu un capac, care conține în partea interioară un strat de gel de agaroză de 3...5 mm, obținut prin amestecarea unei soluții de 1% de agaroză cu temperatura de 50...55°C cu o soluție, care conține 0,18 M de tartrat de sodiu și potasiu și 0,08 M de hidroxid de cupru (II), în raport de 4:1, cu pH-ul 9,0...9,7. Probele se incubează la temperatura de 37°C, timp de 2 ore, după care capacul cu gelul de agaroză se introduce în cititorul de plăci și se măsoară absorbanta la lungimea de undă de 320 nm, apoi se calculează capacitatea de producere a hidrogenului sulfurat sub influența substanțelor cercetate după formula:

CP (%) = 100 - [1 - (Apr - Ab) / (Ak - Ab)] * 100, unde:

CP (%) - capacitatea de producere a hidrogenului sulfurat;

Apr - absorbanta probei de cercetat;

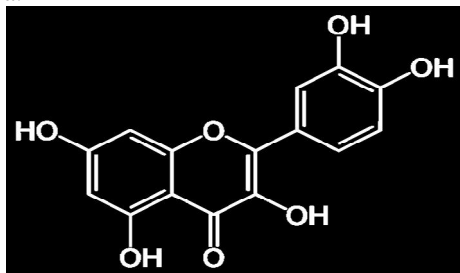
Ak - absorbanta probei de control;

Ab - absorbanta probei blank;

în cazul în care capacitatea de producere a hidrogenului sulfurat este mai mare de 100%, substanța cercetată activează capacitatea de producere a hidrogenului sulfurat, iar dacă este mai mică de 100%, substanța cercetată inhibă capacitatea de producere a hidrogenului sulfurat.

Hidroxidul de cupru (II) folosit pentru captarea H₂S este o substanță care în conformitate cu Directiva 67/548 / CEE - Consiliul Comunității Economice Europene este o substanță puțin toxică, care nu este clasificată ca periculoasă și este aprobată în diferite țări pentru utilizare în agricultură împotriva bolilor fungice și bacteriene (REGULAMENTUL (CE) NR. 1272/2008 AL PARLAMENTULUI EUROPEAN ȘI AL CONSILIULUI din 16 decembrie 2008 privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și a amestecurilor, de modificare și de abrogare a Directivelor 67/548/CEE și 1999/45/CE, precum și de modificare a Regulamentului (CE) nr. 1907/2006).

Quercetina este un flavonoid natural important (Alexander Victor Anand David, Radhakrishnan Arulmoli, Subramani Parasuraman. Overviews of Biological Importance of Quercetin: A Bioactive Flavonoid. Pharmacogn Rev., 2016 Jul-Dec., vol. 10(20), p. 84-89), cu formula:



Exemple de realizare a invenției
Exemplul 1

Se pregătesc diluțiile de lucru ale substanței de cercetat PV-1 în soluție de 0,05 M de tampon fosfat cu pH-ul 7,4. Apoi se pregătește omogenizatul tisular, și anume din țesutul hepatic: 0,5 g de țesut hepatic se omogenizează timp de 30...60 s cu 4,5 mL de soluție de 0,05 M de tampon fosfat cu pH-ul 7,4, care conține o soluție de 1% de 3-[(3-

cholamidopropil)dimetilamonio]-1-propanesulfonat hidrat (CHAPS), răcit pe gheață, după care probele se îngheață, apoi se dezgheață la temperatura camerei, timp de 5...10 min. Înghețarea și dezghețarea omogenizatului se repetă de 2 ori. Omogenizatului se centrifughează timp de 10 min la temperatura de 4°C, la 500,0 x g, apoi se determină concentrația de proteină în omogenizat.

5 Supernatantul poate fi păstrat într-un congelator la temperatura de - 40°C, sau folosit imediat la montarea probelor de cercetat. Înainte de utilizare, omogenizatului tisular se diluează cu soluție de 0,05 de tampon fosfat până la concentrația de 10 mg proteină/mL.

În godeurile B2 și B4, D2 și D4, F2 și F4 (probe paralele de cercetat) ale plăcii fotometrice cu 96 godeuri se pipetează câte 15 μL de diluție a substanței de cercetat (respectiv 7,81; 31,25; 10 50,0 μM/L), iar în godeurile B6 și B8 (probe de control) se pipetează câte 15 μL de soluție de 0,05 M de tampon fosfat cu pH-ul 7,4. Apoi în godeurile B2 și B4, D2 și D4, F2 și F4 (probe paralele de cercetat), B6 și B8 (probe de control) se adaugă câte 100 μL soluție de 0,05 de tampon fosfat cu pH-ul 7,4, care conține omogenizat tisular cu concentrația de 1,0 mg proteină/mL, obținut în urma omogenizării țesutului hepatic cu o soluție de 0,05 M de tampon fosfat cu pH-ul 7,4, care conține 15 soluție de 1% de 3-[(3-cholamidopropil)dimetilamonio]-1-propanesulfonat hidrat (CHAPS).

În calitate de substanță de referință se folosește quercetina în concentrație de 50,0 μM/L, pentru care în godeurile D6 și D8 se pipetează câte 15 μL de soluție de 50,0 μM/L de quercetină. Apoi se pregătesc probele blank: în godeurile B10 și D10 se pipetează aceleași ingrediente ca și în probele de control, însă omogenizatului tisular se înlocuiește cu 100 μL de soluție de 0,05 M de 20 tampon fosfat cu pH-ul 7,4, care conține o soluție de 1% de 3-[(3-cholamidopropil)dimetilamonio]-1-propanesulfonat hidrat (CHAPS).

Placa se incubează la temperatura de 37°C, timp de 5...10 min, după care în toate godeurile se adaugă câte 50 μL de amestec, care conține o soluție de 0,05 M de tampon fosfat cu pH-ul 7,4, 0,2 μM de L-cisteină (concentrația finală de 0,8) și 0,02 μM/L de piridoxal 5'-fosfat (concentrația finală de 0,08 mM/L). Apoi, placa se acoperă cu un capac, care conține în partea 25 interioară un strat de gel de agaroză de 3 mm, obținut prin amestecarea soluției de 1% de agaroză cu temperatura de 50...55°C cu o soluție, care conține 0,18 M de tartrat de sodiu și potasiu și 0,08 M de hidroxid de cupru (II), în raport de 4:1 (v/v), cu pH-ul 9,0. Placa se introduce imediat în termostat și se incubează la temperatura de 37°C, timp de 2 ore, după care capacul cu 30 gelul de agaroză se scoate de pe placă, se introduce în cititorul de plăci și se măsoară absorbanta la lungimea de undă de 320 nm. Apoi se calculează capacitatea de producere a hidrogenului sulfurat sub influența substanței cercetate după formula:

$CP(\%) = 100 - [1 - (Apr - Ab) / (Ak - Ab)] * 100$, unde:

CP(%) - capacitatea de producere a hidrogenului sulfurat;

35 Apr - absorbanta probei de cercetat;

Ak - absorbanta probei de control;

Ab - absorbanta probei blank;

în cazul în care capacitatea de producere a hidrogenului sulfurat este mai mare de 100%, substanța cercetată activează capacitatea de producere a hidrogenului sulfurat, iar dacă este mai mică de 40 100%, substanța cercetată inhibă capacitatea de producere a hidrogenului sulfurat.

La măsurarea absorbantei s-a obținut:

Absorbanta probei de cercetat (Apr) la testarea substanței PV-1:

pentru concentrația de 7,81 μM/L - 0,285

pentru concentrația de 31,25 μM/L - 0,292

pentru concentrația de 50,0 μM/L - 0,316

Absorbanta probei de control (Ak) - 0,254.

45 Absorbanta probei de referință - quercetină (Aquer) - pentru concentrația de 50,0 μM/L - 0,323.

Absorbanta probei blank (Ab) - 0,076.

Notă: - sunt prezentate valorile medii ale absorbantei a 2 determinări paralele.

Astfel, capacitatea de producere de H₂S (%) (pentru concentrația de 7,81 μM/L) = [(0,285-0,076)/(0,254-0,076)]*100 = [(0,209)/(0,178)]*100 = 117,4.

50 Capacitatea de producere de H₂S (în procente) (pentru concentrația de 31,25 μM/L) = [(0,292-0,076)/(0,254-0,076)]*100 = [(0,216)/(0,178)]*100 = 121,3.

Capacitatea de producere de H₂S (în procente) (pentru concentrația de 50,0 μM/L) = [(0,316-0,076)/(0,254-0,076)]*100 = [(0,240)/(0,178)]*100 = 134,8.

55 Capacitatea de producere de H₂S (în procente) - quercetina (pentru concentrația de 50 μM/L) = [(0,323-0,076)/(0,254-0,076)]*100 = [(0,247)/(0,178)]*100 = 139,0.

La testarea substanței PV-1 s-a stabilit că aceasta posedă o capacitate de producere a H₂S, care se deosebește puțin de cea exercitată de quercetină. Capacitatea de producere procentuală a H₂S maximă la concentrația de 50 μM/L pentru substanța PV-1 constituie 134,8%, pe cand quercetina a prezentat o capacitate maximă de 139,0% la concentrația de 50 μM/L.

5 Exemplul 2

Se pregătesc diluțiile de lucru ale substanței de cercetat BV-2 în soluție de 0,05 M de tampon fosfat cu pH-ul 7,4. Apoi se pregătește omogenizatul tisular, și anume din țesutul hepatic: 0,5 g de ficat se omogenizează, timp de 30...60 s cu 4,5 mL de soluție de 0,05 M de tampon fosfat cu pH-ul 7,4, care conține o soluție de 1% de 3-[(3-cholamidopropil)dimetilamonio]-1-propanesulfonat hidrat (CHAPS) răcit pe gheață, după care probele se îngheață, apoi se dezgheață la temperatura camerei, timp de 5...10 min. Înghețarea și dezghețarea omogenizatului se repetă de 2 ori. Omogenizatul se centrifughează timp de 10 min la temperatura de la 4°C, la 500,0 x g. Apoi se determină concentrația de proteină în omogenizat. Supernatantul poate fi păstrat într-un congelator la temperatura de -40°C sau folosit imediat la montarea probelor de cercetat. Inainte de 15 utilizare omogenizatul tisular se diluează cu o soluție de 0,05M de tampon fosfat, cu pH 7,4 până la concentrația de 30 mg proteină/mL.

În godeurile B2 și B4, D2 și D4, F2 și F4 (probe paralele de cercetat) ale plăcii fotometrice cu 96 godeuri se pipetează câte 15 μL de diluție a substanței de cercetat (respectiv 50,0; 31,25; 7,81 μM/L), iar în godeurile B6 și B8 (probe de control) se pipetează câte 15 μL de o soluție de 20 0,05 M de tampon fosfat cu pH-ul 7,4. Apoi în godeurile B2 și B4, D2 și D4, F2 și F4 (probe paralele de cercetat), godeurile B6 și B8 (probe de control) se adaugă câte 100 μL de soluție, care conține omogenizat tisular cu concentrația de 3,0 mg proteină/mL, obținut în urma omogenizării tisulare cu o soluție de 0,05 M de tampon fosfat cu pH-ul 7,4, care conține o soluție de 1% de 3-[(3-cholamidopropil)dimetilamonio]-1-propanesulfonat hidrat (CHAPS).

În calitate de substanță de referință se folosește quercetina în concentrație de 50,0 μM/L, pentru care în godeurile D6 și D8 se pipetează câte 15 μL de soluție de 50,0 μM/L de quercetină. Apoi se pregătește probele blank: în godeurile B10 și D10 se pipetează aceleași ingrediente ca și în probele de control, însă omogenizatul tisular se înlocuiește cu 100 μL de soluție de 0,05 M de tampon fosfat cu pH-ul 7,4, care conține o soluție de 1% de 3-[(3-cholamidopropil)dimetilamonio]-1-propanesulfonat hidrat (CHAPS).

Placa se incubează la temperatura de 37°C, timp de 5...10 min, după care în toate godeurile se adaugă câte 50 μL de amestec, care conține o soluție de 0,05 M de tampon fosfat cu pH-ul 7,4, 0,4 μM de L-cisteină (concentrația finală de 1,6 mM/L) și 0,04 μM/L de piridoxal 5'-fosfat (concentrația finală de 0,16 mM/L). Apoi placa se acoperă cu un capac, care conține în 35 partea interioară un strat de gel de agaroză de 5 mm, obținut prin amestecarea soluției de 1% de agaroză cu temperatura de 50...55°C cu o soluție, care conține 0,18 M de tartrat de sodiu și potasiu și 0,08 M de hidroxid de cupru (II) cu pH-ul 9,7. Placa se introduce imediat în termostat și se incubează la temperatura de 37°C, timp de 2 ore. Apoi capacul cu gelul de agaroză se scoate de pe placă, se introduce în cititorul de plăci și se măsoară absorbanta la lungimea de undă de 320 40 nm, apoi se calculează capacitatea de producere a hidrogenului sulfurat sub influența substanțelor cercetate după formula:

$$CP (\%) = 100 - [1 - (Apr - Ab) / (Ak - Ab)] * 100, \text{ unde:}$$

CP (%) - capacitatea de producere a hidrogenului sulfurat;

Apr - absorbanta probei de cercetat;

45 Ak - absorbanta probei de control;

Ab - absorbanta probei blank;

in cazul in care capacitatea de producere a hidrogenului sulfurat este mai mare de 100%, substanța cercetată activează capacitatea de producere a hidrogenului sulfurat, iar dacă este mai mică de 100%, substanța cercetată inhibă capacitatea de producere a hidrogenului sulfurat.

50 La măsurarea absorbantei s-a obținut:

Absorbanta probei de cercetat (Apr) la testarea substanței BV-2:

pentru concentrația de 7,81 μM/L 0,464

pentru concentrația de 31,25 μM/L 0,387

pentru concentrația de 50,0 μM/L 0,310

Absorbanta probei de control (Ak) - 0,551.

Absorbanta probei de referință - quercetină (Aquer) - pentru concentrația de 50,0 μM/L - 0,730.

55 Absorbanta probei blank (Ab) - 0,103.

Notă: - sunt prezentate valorile medii ale absorbantei a 2 determinări paralele.

Astfel, CP (%) (pentru concentrația de 7,81 $\mu\text{M/L}$) = $[(0,464-0,103)/(0,551-0,103)]*100 = [0,361/0,448]*100 = 80,6$.

CP (%) (pentru concentrația de 31,25 $\mu\text{M/L}$) = $[(0,387-0,103)/(0,551-0,103)]*100 = [0,281/0,448]*100 = 63,4$.

5 CP (%) (pentru concentrația de 50 $\mu\text{M/L}$) = $[(0,310-0,103)/(0,551-0,103)]*100 = [0,185/0,448]*100 = 76,2$.

CP (%) quercetină (pentru concentrația de 50,0 $\mu\text{M/L}$) = $[(0,730-0,103)/(0,551-0,103)]*100 = [0,627/0,448]*100 = 140,0$.

10 Deci, substanța BV-2 are proprietatea de a inhiba producerea de hidrogen sulfurat (H_2S), ceea ce se manifestă prin reducerea capacității procentuale de producere a H_2S la diferite concentrații. Producerea procentuală de hidrogen sulfurat (H_2S) la concentrația de 50,0 $\mu\text{M/L}$ pentru substanța PV-2 s-a redus până la 76,2%, pe când pentru quercetină capacitatea procentuală de producere a H_2S la concentrația de 50 $\mu\text{M/L}$ constituie 140,0 %.

15 Analogic exemplurilor de mai sus au fost cercetate și alte concentrații ale omogenizatului tisular (0,05...5,0 mg/mL), ale concentrației soluției de 0,05 M de tampon fosfat cu pH-ul 7,4, L-cisteină - 2,0...8,0 mM (concentrația finală de 8,0...32,0 mM/L) și piridoxal 5'-fosfat - 0,2...0,8 mM/L (concentrația finală de 0,8...3,2 mM/L), ale raportului dintre soluția de 1% de agaroză și soluția, care conține 0,18 M de tartrat de sodiu și potasiu și 0,08 M de hidroxid de cupru (II): 3:1; 4:1; 5:1 ale pH-ului soluției 7,5...10,0, iar absorbanta probelor a fost măsurată în intervalul
20 lungimilor de undă de 310...450 nm.

Experiențele au permis de a stabili limitele optime ale soluției de omogenizat tisular - 1,0...3,0 mg proteină/ml în soluție de 0,05 M de tampon fosfat cu pH-ul 7,4, ale amestecului, care conține soluție de 0,05 M de tampon fosfat cu pH-ul 7,4, 0,2...0,4 μM de L-cisteină (concentrația finală de 0,8...1,6 mM/L) și 0,02...0,04 $\mu\text{M/L}$ de piridoxal 5'-fosfat (concentrația finală de 0,08...0,16 mM/L); ale gelului de agaroză de 3...5 mm, obținut prin amestecarea soluției de 1% de agaroză cu temperatura de 50...55 $^{\circ}\text{C}$ cu soluția, care conține 0,18 M de tartrat de sodiu și de potasiu și 0,08 M de hidroxid de cupru (II) în raportul 4:1 (v/v), cu pH-ul 9,0...9,7; ale absorbantei la lungimea de undă de 320 nm pentru obținerea efectului pozitiv.

30 Analizele au fost efectuate în Laboratorul de Biochimie al USMF (în volum de 300 analize), iar rezultatele obținute au permis de a argumenta efectul pozitiv și avantajul metodei propuse față de cea mai apropiată soluție. La folosirea metodei descrise se mărește precizia și reproductibilitatea metodei în comparație cu cea mai apropiată soluție, se exclude folosirea reactivelor extrem de toxici. Aceasta permite de a depista mai precis efectele diferitor concentrații ale substanțelor testate asupra producției de H_2S , se micșorează cheltuielile de reagenți, se exclude
35 folosirea substanțelor extrem de toxice, crește productivitatea muncii cu un efect economic apreciabil.

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Zaorska E., Konop M., Ostaszewski R. et al. Salivary Hydrogen Sulfide Measured with a New Highly Sensitive Self-Immolative Coumarin-Based Fluorescent Probe. *Molecules*. 2018 Sep 3, vol. 23(9). P. E2241. doi: 10.3390/molecules23092241.
2. Christopher Hine and James R. Mitchell. Endpoint or Kinetic Measurement of Hydrogen Sulfide Production Capacity in Tissue Extracts. *Bio Protoc.*, 2017 July 5, vol. 7(13), e2382. doi:10.21769/BioProtoc.2382.

(57) Revendicări:

Metoda de apreciere a influenței substanțelor biologice active asupra capacității de producere a hidrogenului sulfurat de către un țesut biologic, care constă în aceea că se pregătesc substanțele pentru testare în diferite concentrații, care se amestecă cu o soluție de 0,05 M de tampon fosfat cu pH-ul 7,4, după care se pregătește omogenizatul tisular, în care se utilizează țesutul hepatic, care se omogenizează timp de 30...60 s cu o soluție de 0,05 M de tampon fosfat cu pH-ul 7,4, care conține o soluție de 1% de 3-[(3-cholamidopropil)dimetilamonio]-1-propanesulfonat hidrat, după care probele se îngheață și se dezgheață la temperatura camerei, timp de 5...10 min, iar procedura de înghețare și dezghețare se repetă de 2 ori, apoi omogenizatul tisular se centrifughează timp de 10 min la temperatura de 4°C și se determină concentrația de proteină în omogenizat; se pregătesc probele de cercetat, de control și probele blank cu utilizarea plăcii fotometrice cu godeuri, în probele de cercetat se pipetează substanța de cercetat în diverse diluții, iar în probele de control se pipetează o soluție de 0,05 M de tampon fosfat cu pH-ul 7,4 și quercetină în calitate de substanță de referință, apoi în ambele probe se adaugă omogenizat tisular pregătit cu o soluție de 0,05 M de tampon fosfat cu pH-ul 7,4, în concentrație de 1,0...3,0 mg proteină/mL, probele blank se montează la fel ca și probele de control, iar omogenizatul tisular se înlocuiește cu soluția de 0,05 M de tampon fosfat cu pH-ul 7,4, care conține o soluție de 1% de 3-[(3-cholamidopropil)dimetilamonio]-1-propanesulfonat hidrat; placa cu probele pregătite se incubează la temperatura de 37°C, timp de 5...10 min, după care în toate godeurile se adaugă un amestec, ce conține o soluție de 0,05 M de tampon fosfat cu pH-ul 7,4, 0,2...0,4 μM/L de L-cisteină (concentrația finală de 0,8...1,6 mM/L) și 0,02...0,04 μM/L de piridoxal 5'-fosfat (concentrația finală de 0,08...0,16 mM/L), apoi probele se acoperă cu un capac, care conține în partea interioară un strat de gel de agaroză de 3...5 mm, obținut prin amestecarea unei soluții de 1% de agaroză cu temperatura de 50...55°C cu o soluție, care conține 0,18 M de tartrat de sodiu și potasiu și 0,08 M de hidroxid de cupru (II), în raport de 4:1, cu pH-ul 9,0...9,7; probele se incubează la temperatura de 37°C, timp de 2 ore, după care capacul cu gelul de agaroză se introduce în cititorul de plăci și se măsoară absorbanta la lungimea de undă de 320 nm, apoi se calculează capacitatea de producere a hidrogenului sulfurat sub influența substanțelor cercetate după formula:

$$CP(\%) = 100 - [1 - (Apr - Ab) / (Ak - Ab)] * 100, \text{ unde:}$$

CP(%) - capacitatea de producere a hidrogenului sulfurat;

Apr - absorbanta probei de cercetat;

Ak - absorbanta probei de control;

Ab - absorbanta probei blank;

în cazul în care capacitatea de producere a hidrogenului sulfurat este mai mare de 100%, substanța cercetată activează capacitatea de producere a hidrogenului sulfurat, iar dacă este mai mică de 100%, substanța cercetată inhibă capacitatea de producere a hidrogenului sulfurat.