

Invenția se referă la medicină și biochimie și poate fi folosită pentru aprecierea activității atero-protective a substanțelor biologic active.

Familia paraoxonazelor (PON)/arilesterazelor include un grup de proteine cu proprietăți biocatalitice prezente în trei izoforme (PON1, PON2, PON3), codificate de genele PON1, PON2 și PON3. Ele au roluri multifuncționale în organism, participând în diverse căi homeostazice, cum ar fi protecția împotriva daunelor oxidative și peroxidării lipidice, N-homocisteinizării, procesele de detoxifiere a xenobioticelor, bioactivare a medicamentelor, în reglarea imunității înnăscute, proliferării și apoptozei celulare, acestora fiind atribuite unul dintre factorii genetici ai longevității în populație (Shunmoogam N., Naidoo P., Chilton R. Paraoxonase (PON)-1: a brief overview on genetics, structure, polymorphisms and clinical relevance. *Vascular Health and Risk Management*, 2018, no 14, p. 137-143).

Cea mai studiată enzimă a familiei PON este izoforma PON1/arilesteraza care este o esterază, implicată în metabolizarea/detoxifierea compușilor organofosforici (cum ar fi paraoxonul și diazoxonul), dar și altor compuși. Este sintetizată în ficat și apoi eliminată în plasma sanguină, unde se asociază la lipoproteinele cu densitate înaltă (HDL), fiind responsabilă de mecanismul prin care acestea inhibă acumularea peroxizilor lipidici în lipoproteinele cu densitate joasă (LDL) și în HDL însăși. PON1/arilesteraza manifestă proprietăți atero-protective, anti-aterogene, cardio-protective și vaso-protective, deoarece ea previne acumularea lipoproteinelor cu densitate joasă (LDL) oxidate în intima vasculară și reacția pro-inflamatorie ulterioară mediată de macrofage - două evenimente-cheie care se produc în timpul dezvoltării aterosclerozei. Totodată, activitatea scăzută a PON1/arilesterazei este puternic corelată cu riscul dezvoltării bolilor cardiovasculare severe, infarctului de miocard și aterosclerozei (Sözmen E.Y., Sözmen B., Girgin F.K., Delen Y., Azarsiz E., Erdener D., et al. Antioxidant enzymes and paraoxonase show a coactivity in preserving low-density lipoprotein from oxidation. *Clin. Exp. Med.* 2001. No. 1(4), p. 195- 199; Kowalska K., Socha E., Milnerowicz H. Review: The role of paraoxonase in cardiovascular diseases. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 2015 Spring. No. 45(2), p. 226-233; Irina Ilea, Caius Duncea, Andreea Parv. Paraoxonaza - implicații în aterogeneză, aspecte biochimice și genetice. *Clujul Medical*, 2010, vol.LXXXII, nr.1, p. 9-12).

Prin urmare, activarea terapeutică a acestei enzime este o contribuție nouă, deoarece compușii care induc activitatea PON1/arilesterazei în organism manifestă un puternic efect atero-protectiv, anti-aterogen, cardio-protectiv, vaso-protectiv și anti-inflamator curativ (Costa L.G., Giordano G., Furlong C.E. Pharmacological and dietary modulators of paraoxonase 1 (PON1) activity and expression: the hunt goes on. *Biochem Pharmacol.* 2011, no. 81(3), p. 337-344).

Pentru a examina noi compuși cu efecte atero-protective sunt necesare metode disponibile pentru selectarea substanțelor bioactive care ar stimula activitatea PON 1/arilesterazei, fapt ce poate aduce beneficii importante sănătății umane.

Sunt cunoscute metodele pentru aprecierea activității atero-protective, anti-aterogene cardio-protective, vaso-protective a substanțelor biologic active care se bazează pe determinarea activității PON 1/arilesterazei în experiențe *in vivo*, pentru ce activitatea PON 1/arilesterazei se măsoară în probele biologice, prelevate de la organisme vii (animale sau ființe umane) până la administrarea substanțelor biologic active și, apoi repetat, după administrarea substanțelor biologic active, totodată, cu cât este mai înaltă activitatea PON 1/arilesterazei după administrarea substanțelor biologic active cu atât este mai mare activitatea atero-protectivă, anti-aterogenă cardio-protectivă și vaso-protectivă (Nayereh Parsaeyan, Hassan Mozaffari-Khosravi, Mohammad Reza Mozayan. Effect of pomegranate juice on paraoxonase enzyme activity in patients with type 2 diabetes. *J. Diabetes Metab. Disord.* 2012, 11:11. (<http://www.jdmndonline.com/content/11/11>); Tsakiris S., Karikas G. A., Parthimos T., Tsakiris T., et al. Alpha-tocopherol supplementation prevents the exercise-induced reduction of serum paraoxonase1/arylesterase activities in healthy individuals. *European Journal of Clinical Nutrition*, 2009, vol.63, p. 215-221) [1].

Neajunsul acestor metode constă în faptul că ele sunt costisitoare, economic dezavantajoase, deoarece prevăd utilizarea organismelor vii (animale, ființe umane). Un alt neajuns al acestor metode constă în complexitatea și durata mare de timp cheltuit la realizarea lor, fapt ce influențează negativ asupra sensibilității, reproductibilității și precizității, cost-eficienței acestor metode. Un alt neajuns al acestor metode constă în toxicitatea înaltă a compușilor folosiți în calitate de substrat al reacției enzimatică - paraoxonului și fenil acetatului, fapt ce necesită măsuri speciale de precauție și securitate suplimentare (Directiva 67/548/CEE, Food and Drug Administration and the National Cancer Institute, USA).

Cea mai apropiată după esența tehnică și rezultatul obținut este metoda pentru aprecierea activității anti-aterogene și a riscului cardiovascular la pacienții cu insuficiență renală, care prevede determinarea activității PON 1/arilesterazei, utilizând diferite substraturi sintetice, inclusiv 4-nitro-fenil acetatul cu concentrația de 0,625 mM, dizolvat în soluție tampon Tris-HCl cu pH-ul 7,4, ce conține 2,5% metanol și 1,0 mM de CaCl₂, iar produsul final al reacției enzimatică p-nitrofenolul se măsoară la 402 nm, totodată, cu cât este mai joasă activitatea PON 1/arilesterazei, cu atât este mai mare riscul complicațiilor cardiovasculare, legate de dezvoltarea accelerată a aterosclerozei și reducerea proprietăților anti-aterogene și a îmbătrânirii vasculare premature, comparativ cu subiecții condiționat sănătoși [2].

Metoda indicată prezintă un șir de dezavantaje printre care înrolarea în studiu a pacienților și, deasemenea, utilizarea substanțelor toxice cum ar fi metanolul, paraoxonul și fenil-acetatul. Un alt neajuns al metodei indicate constă în aceea că ea nu prevede selectarea substanțelor bioactive în condiții *in vitro* cu excluderea organismelor vii, fapt, ce ar permite simplificarea metodei și reducerea cheltuielilor de timp, mărirea sensibilității, reproductibilității și preciziei metodei, creșterea productivității muncii și a eficienței economice.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în eliminarea dezavantajelor menționate și anume elaborarea unei metode mai exacte și care ar permite de a mări sensibilitatea, precizia și reproductibilitatea metodei prin excluderea folosirii organismelor vii (animale, ființe umane), elaborarea condițiilor optime de efectuare a reacției enzimatice, reducerea cheltuielilor de timp, creșterea productivității muncii și eficienței economice. Deasemenea, se exclude folosirea substanțelor toxice, cum ar fi metanolul, paraoxonul și fenil-acetatul, iar para-nitrofenil acetatul folosit în calitate de substrat al reacției enzimatice este o substanță care nu este considerată toxică.

Esența invenției constă în aceea că substanțele biologic active în diferite concentrații se amestecă cu o soluție ce conține 20,8...1,6 UI/l de PON1/arilesterază în 0,05 M soluție tampon fosfat cu pH-ul 7,4 (concentrația finală 10,4...20,8 UI/l), apoi se incubează la temperatura de 37°C, timp de 5...10 min, după care se adaugă un mediu de reacție ce conține 1,5...2,5 mM de p-nitrofenil acetat (concentrația finală 1,37...2,28 mM/l), 1,0...2,0 mM/l de CaCl₂ (concentrația finală 0,91...1,82 mM/l) și 10,0...20,0 μM/l de cloramină T (concentrația finală 9,1...18,3 μM/l) în 0,05 M soluție tampon fosfat cu pH-ul 7,4 cu obținerea probei de cercetat, proba de control se pregătește identic ca proba de cercetat, dar substanța de testat se înlocuiește cu o cantitate echivalentă de soluție de 0,05 M tampon fosfat cu pH-ul 7,4, iar proba blanc se pregătește identic ca proba de control, dar mediul de reacție nu conține enzima PON1/arilesterază, apoi se determină absorbanta inițială A₁ la 405...410 nm, după care probele se incubează la temperatura de 37°C, timp de 30 min și se măsoară repetat absorbanta A₂ la 405...410 nm, apoi se calculează procentul de activare a PON 1/arilesterazei substanțelor cercetate după formula: procentul de activare = $100 \cdot [1 - (\Delta Apr - Ab) / (Ak - Ab)]$, unde:

Δ Apr - diferența dintre absorbanta A₂ și absorbanta A₁ a probei de cercetat;

Ak - absorbanta probei de control;

Ab - absorbanta probei blanc,

totodată, cu cât este mai mare procentul de activare, cu atât activitatea atero-protectivă a substanțelor cercetate este mai mare.

Rezultatul tehnic al invenției constă în reducerea timpului cheltuit la realizarea analizei, creșterea productivității muncii și eficienței economice, mărirea sensibilității, preciziei și reproductibilității metodei de apreciere a compușilor cu acțiune atero-protectivă, anti-aterogenă în baza determinării activității paraoxonazei 1 (PON 1/arilesterazei) datorită folosirii enzimei PON1/ arilesterazei, a soluției de oxidant - cloramină T și excluderii folosirii organismelor vii (animale de laborator, ființe umane) și a reactivilor toxici. Mărirea sensibilității, precizității și reproductibilității determinărilor este asigurată de determinarea ΔApr – diferenței dintre absorbanta A₂ a probei de cercetat după 30 min de incubare și absorbanta inițială A₁ a probei de cercetat, ceea ce permite de a exclude eroarea datorată colorației substanțelor cercetate.

Metoda se efectuează în modul următor: în microplaca fotometrică cu 96 de godeuri se toarnă câte 20 μl diluții de lucru de substanțe biologic active, se adaugă consecutiv în toate godeurile câte 20 μl soluție ce conține 20,8...41,6 UI/l de PON1/arilesterază în 0,05 M tampon fosfat cu pH-ul 7,4 (concentrația finală 10,4...20,8 UI/l), se incubează timp de 5...10 min la temperatura de 37°C, după ce se adaugă mediul de reacție care conține 1,5...2,5 mM de p-nitrofenil acetat (concentrația finală 1,37...2,28 mM/l), 1,0...2,0 mM/l CaCl₂ (concentrația finală 0,91...1,82 mM/l) și 10,0...20,0 μM/l cloramină T (concentrația finală 9,1...18,3 μM/l) în 0,05 M tampon fosfat cu pH-ul 7,4. Proba de control se pregătește identic ca și proba de cercetat, dar în loc de substanțe de testat se toarnă o cantitate echivalentă de soluție de 0,05 M soluție tampon fosfat cu pH-ul 7,4. Se pregătește în dublicat. Proba blanc se pregătește identic ca și proba de control, dar mediul de reacție nu conține enzima PON1/ arilesterază. Se pregătește în dublicat. În calitate de substanță de referință se folosește quercetina.

Toate probele se pregătesc în duplicat. Microplaca se introduce imediat în spectrofotometrul cu plăci la temperatura de 37°C, se agită 10...15 s și se măsoară absorbanta inițială A₁ la 405...410 nm și apoi după 30 min de incubare la temperatura de 37°C se măsoară repetat absorbanta A₂ la 405...410 nm, apoi se calculează ΔApr – diferența dintre A₂ și A₁ și se calculează procentul de activare a PON 1/arilesterazei substanțelor cercetate după formula: procentul de activare = $100 \cdot [1 - (\Delta Apr - Ab) / (Ak - Ab)]$, unde:

ΔApr - diferența dintre absorbanta A₂ și absorbanta A₁ a probei de cercetat;

Ak - absorbanta probei de control;

Ab - absorbanta probei blanc,

totodată, cu cât este mai mare procentul de activare, cu atât activitatea atero-protectivă a substanțelor cercetate este mai mare.

p-nitrofenil acetat, substrat chromogenic pentru determinarea activității paraoxonazei 1 (PON1)/arilesterazei cu formula generală C₈H₇NO₄ și masa molară 181,15 g/mol. Produsul de scindare a substratului de către PON1)/arilesterază este p-nitrofenolul. În conformitate cu Directiva 67/548 / CEE - Consiliul Comunității Economice Europene p-nitrofenil acetatul este o substanță netoxică, care nu este clasificată ca periculoasă.

Exemplul 1

Se pregătesc diluțiile de lucru ale substanței de cercetat în 0,05 M soluție de tampon fosfat cu pH-ul 7,4. În godeurile nr. 1 și 2, 3 și 4, 5 și 6 (probe paralele de cercetat) ale microplăcii fotometrice cu 96 godeuri se pipetează câte 20 μl de diluție a substanței de cercetat (respectiv 50,0; 31,25; 7,81; 1,95 μM/l), iar în godeurile nr. 7 și 8 (proba de control) și nr. 9 și 10 (proba blanc) se pipetează câte 20 μl soluție de 0,05 M de tampon fosfat cu pH-ul 7,4. Apoi în godeurile nr. 1 și 2, 3 și 4, 5 și 6 (probe paralele de cercetat), nr. 7 și 8 (proba de control) se adaugă câte 20 μl soluție ce conține 20,8 UI/l PON1/arilesterază în 0,05 M soluție tampon fosfat cu pH-ul 7,4

(concentrația finală 10,4 UI/l), se amestecă 10 s și se incubează 10 min la temperatura de 37°C, după ce se adaugă câte 210 μl mediu de reacție care conține 1,5 mM/l de p-nitrofenil acetat (concentrația finală 1,37 mM/l), 1,0 mM/l CaCl₂ (concentrația finală 0,91 mM/l) și 10,0 μM/l cloramină T (concentrația finală 9,13 μM/l) în 0,05 M tampon fosfat cu pH-ul 7,4. În godeurile nr. 7 și 8 (proba de control) și nr. 9 și 10 (proba blank) se adaugă câte 210 μl mediu de reacție. În calitate de substanță de referință se folosește quercetina în concentrația de 50 μM/l. Microplaca se introduce imediat în spectrofotometrul cu plăci la temperatura de 37°C, se agită 10 s și se măsoară absorbanta inițială A1 la 405 nm și apoi după 30 min de incubare la temperatura de 37°C se măsoară repetat absorbanta A2 la 405 nm, apoi se calculează ΔApr – diferența dintre A2 și A1 și se calculează procentul de activare a PON 1/arilesterazei substanței cercetate după formula: procentul de activare = $100 \cdot [1 - (\Delta Apr - Ab) / (Ak - Ab)] \cdot 100$, unde:
 ΔApr - diferența dintre absorbanta A2 și absorbanta A1 a probei de cercetat;
 Ak - absorbanta probei de control;
 Ab - absorbanta probei blank.

La măsurarea absorbantei s-a obținut:

Absorbanta (A) la 405 nm*	Concentrația substanței testate X1 (μM/l)				Concentrația substanței de referință (μM/l)
	1,95	7,81	31,25	50	
Diferența dintre absorbanta A2 a probei de cercetat și absorbanta A1 a probei de cercetat (ΔApr) -	0,353	0,375	0,413	0,448	-
A probei de control (Ak) -	0,347	0,354	0,347	0,36	0,348
A probei blank (Ab) -	0,024	0,026	0,023	0,025	0,025
A probei de referință - quercetina (A _{quer}) -	-	-	-	-	0,483

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

Procentul de activare (pentru concentrația 1,95 μM/l) = $100 \cdot [1 - (0,353 - 0,024) / (0,347 - 0,024)] \cdot 100 = 101,9$.

Procentul de activare (pentru concentrația 7,81 μM/l) = $100 \cdot [1 - (0,375 - 0,026) / (0,354 - 0,026)] \cdot 100 = 106,4$.

Procentul de activare (pentru concentrația 31,25 μM/l) = $100 \cdot [1 - (0,413 - 0,023) / (0,347 - 0,023)] \cdot 100 = 120,4$.

Procentul de activare (pentru concentrația 50 μM/l) = $100 \cdot [1 - (0,448 - 0,025) / (0,360 - 0,025)] \cdot 100 = 126,3$.

Procentul de activare (pentru quercetina concentrația 50,0 μM/l) = $100 \cdot [1 - (0,483 - 0,025) / (0,348 - 0,025)] \cdot 100 = 141,8$.

La testarea substanței X1 s-a stabilit că aceasta posedă o activitate atero-protectivă mai redusă în comparație cu quercetina. Procentul de activare maximală la concentrația 50 μM/l pentru substanța X1 constituie 126,3%, pe când quercetina a prezentat o activitate maximă de 141,8% la concentrația de 50 μM/l.

Exemplul 2

Se pregătesc diluțiile de lucru ale substanței de cercetat în 0,05 M soluție de tampon fosfat cu pH-ul 7,4. În godeurile nr. 1 și 2, 3 și 4, 5 și 6 (probe paralele de cercetat) ale microplăcii fotometrice cu 96 godeuri se pipetează câte 20 μl de diluție a substanței de cercetat (respectiv 50,0; 31,25; 7,81; 1,95 μM/l), iar în godeurile nr. 7 și 8 (proba de control) și nr. 9 și 10 (proba blank) se pipetează câte 20 μl de soluție tampon fosfat de 0,05 M cu pH-ul 7,4. Apoi în godeurile nr. 1 și 2, 3 și 4, 5 și 6 (probe paralele de cercetat), nr. 7 și 8 (proba de control) se adaugă câte 20 μl soluție ce conține 41,6 UI/l PON1/arilesterază în 0,05 M soluție tampon fosfat cu pH-ul 7,4 (concentrația finală 20,8 UI/l), se amestecă 10...15 s și se incubează 10 min la temperatura de 37°C, după ce se adaugă câte 210 μl mediu de reacție care conține 2,5 mM p-nitrofenil acetat (p-NFA) (concentrația finală 2,28 mM/l), 2,0 mM/l CaCl₂ (concentrația finală 1,82 mM/l) și 20,0 μM/l cloramină T (concentrația finală 18,3 μM/l) în 0,05 M tampon fosfat cu pH-ul 7,4. În godeurile nr. 7 și 8 (proba de control) și nr. 9 și 10 (proba blank) se adaugă câte 210 μl mediu de reacție. În calitate de substanță de referință se folosește quercetina în concentrația de 50 μM/l. Microplaca se introduce imediat în spectrofotometrul cu plăci la temperatura de 37°C, se agită 15 s și se măsoară absorbanta inițială A1 la 410 nm, apoi după 30 min de incubare la 37°C se măsoară repetat absorbanta A2 la 410 nm, apoi se calculează ΔApr – diferența dintre A2 și A1 și se calculează procentul de activare a PON 1/arilesterazei substanței cercetate după formula: procentul de activare = $100 \cdot [1 - (\Delta Apr - Ab) / (Ak - Ab)] \cdot 100$, unde:

ΔApr – diferența dintre absorbanta A2 și absorbanta A1 a probei de cercetat;

Ak - absorbanta probei de control;

Ab - absorbanta probei blank.

La măsurarea absorbantei s-a obținut:

Absorbanta (A) la 410 nm*	Concentrația substanței testate X2 (μM/l)				Concentrația substanței de referință (μM/l)
	1,95	7,81	31,25	50	
					50,0

Diferența dintre absorbanta A2 a probei de cercetat și absorbanta A1 a probei de cercetat (ΔA_{pr}) –	0,457	0,5	0,546	0,586	-
A probei de control (A_K) –	0,371	0,364	0,371	0,344	0,358
A probei blanc (A_b) –	0,024	0,026	0,023	0,025	0,025
A probei de referință – quercetină (A_{quer}) –	-	-	-	-	0,492

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

Procentul de activare (pentru concentrația 1,95 $\mu\text{M/l}$) = $100 - [1 - (0,457 - 0,024) / (0,371 - 0,024)] \cdot 100 = 124,8$.

Procentul de activare (pentru concentrația 7,81 $\mu\text{M/l}$) = $100 - [1 - (0,5 - 0,026) / (0,364 - 0,026)] \cdot 100 = 140,2$.

Procentul de activare (pentru concentrația 31,25 $\mu\text{M/l}$) = $100 - [1 - (0,546 - 0,023) / (0,371 - 0,023)] \cdot 100 = 150,3$.

Procentul de activare (pentru concentrația 50 $\mu\text{M/l}$) = $100 - [1 - (0,586 - 0,025) / (0,344 - 0,025)] \cdot 100 = 175,9$.

Procentul de activare (pentru quercetină concentrația 50,0 $\mu\text{M/l}$) = $100 - [1 - (0,492 - 0,025) / (0,358 - 0,025)] \cdot 100 = 140,2$.

La testarea substanței X2 s-a stabilit că aceasta posedă o activitate atero-protectivă moderată manifestată prin procentul de activare moderat al PON1/arilesterază la diferite concentrații, dar care îl depășea pe cel al substanței de referință – quercetinei. Procentul de activare maximală la concentrația de 50,0 $\mu\text{M/l}$ pentru substanța X2 constituie 175,9%, pe când quercetina a prezentat o activitate maximă de 140,2% la concentrația de 50 $\mu\text{M/l}$.

Analogic exemplurilor de mai sus au fost cercetate și alte concentrații ale soluției de PON 1/arilesterază (15,0...60,0 UI/l) (concentrația finală 7,5...30,0 UI/l), ale soluției de 0,5...3,5 mM de p-nitrofenil acetat (p-NFA) în 0,05 M sol. tampon fosfat cu pH-ul 7,4 (concentrația finală 0,46...1,83 mM/l), ale soluției de 0,3...6,0 mM/l CaCl_2 (concentrația finală 0,27...5,46 mM/l) și 0,5...50,0 $\mu\text{M/l}$ cloramină T (concentrația finală 0,46...45,6 $\mu\text{M/l}$) în 0,05 M tampon fosfat cu pH-ul 7,4, iar absorbanta probelor a fost măsurată în intervalul 350 ...450 nm.

Experiențele au permis de a stabili limitele optime ale soluției de PON1/arilesterază 20,8...41,6 UI/l (concentrația finală 10,4...20,8 UI/l), ale soluției de p-nitrofenil acetat (p-NFA) 1,5...2,5 mM (concentrația finală 1,37...2,28 mM/l), ale soluției de 1,0...2,0 mM/l CaCl_2 (concentrația finală 0,91...1,82 mM/l) și 10,0...20,0 $\mu\text{M/l}$ cloramină T (concentrația finală 9,1...18,3 $\mu\text{M/l}$) în 0,05 M tampon fosfat cu pH-ul 7,4 și ale intervalelor de măsurare a absorbantei (405...410 nm) pentru obținerea efectului pozitiv.

Analizele au fost efectuate în Laboratorul de biochimie al universității (în volum de 300 analize), iar rezultatele obținute au permis de a argumenta efectul pozitiv și avantajul metodei propuse față de soluția cea mai apropiată. La folosirea metodei descrise se micșorează timpul de efectuare a analizei de ~ 2...3 ori, se mărește precizia și reproductibilitatea metodei în comparație cu prototipul. Se exclude folosirea reactivilor toxici. Aceasta permite de a depista mai precis efectele atero-protective, manifestate prin creșterea procentului de activare al PON1/arilesterazei la diferite concentrații ale substanțelor testate, se micșorează cheltuielile de reagenți, se exclude folosirea organismelor vii, crește productivitatea muncii cu un efect economic apreciabil.