



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **24577** (13) **U**  
(51) МПК (2006)  
**C12N 5/08**  
**G01N 33/49**

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

**(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ СТАБІЛЬНИХ МЕТАБОЛІТІВ ОКСИДУ АЗОТУ В КУЛЬТУРІ КЛІТИН**

1

2

(21) u200700413

(22) 16.01.2007

(24) 10.07.2007

(46) 10.07.2007, Бюл. № 10, 2007 р.

(72) Комаревцева Ірина Олександрівна, Клімочкіна  
Олена Михайлівна, Андросова Марина Євгенівна,  
Шипілова Інна Володимирівна

(73) Комаревцева Ірина Олександрівна, Клімочкіна  
Олена Михайлівна, Андросова Марина Євгенівна,  
Шипілова Інна Володимирівна

(57) 1. Спосіб визначення вмісту стабільних мета-  
болітів оксиду азоту в культурі клітин, що включає

виявлення рівня нітрит-аніонів і нітрат-аніонів  
шляхом діазотування та попереднього відновлен-  
ня, який **відрізняється** тим, що мононуклеарні  
клітини попередньо культивують протягом 24, 48 і  
72 годин, зменшують об'єм діалізату та масу вико-  
ристовуваних реактивів.

2. Спосіб за п.1, який **відрізняється** тим, що до  
1мл діалізату культури клітин додають 0,1мл реак-  
тиву Гріса та до 0,5мл діалізату додають 0,03г ре-  
активу на основі цинкового пилу.

Корисна модель відноситься до медицини, зо-  
крема до клінічної діагностики, а саме до біохімії.

Оксид азоту впливає на клітинні регуляторні  
системи, які контролюють важливі функції клітини.  
Його можна розглядати як сигнальну молекулу  
багатьох клітинних процесів. Використання куль-  
тури клітин, як моделі дослідження по вивченню  
різноманітних механізмів, дає можливість оцінити  
безпосередню реакцію клітин, виключаючи вплив  
ендокринної та нервової систем. У теперішній час  
активно вивчаються стабільні метаболіти оксиду  
азоту - нітрити ( $\text{NO}_2^-$ ) та нітрати ( $\text{NO}_3^-$ ).

Для визначення стабільних метаболітів оксиду  
азоту існують методи, котрі дозволяють визначити  
нітрати та нітрити відразу після взяття біопсійного  
матеріалу та плазми [Wenmalm A., Benthin G.,  
Edlund A. et al. Metabolism and excretion of nitric  
oxide in humans: an experimental and clinical study //  
Circ. Res. -1993. -№73. -P.-1112-1127]. До таких  
методів відносять хемілюмінесцентні (реакція з  
озоном), іонометричні та спектрофотометричні (з  
оксигемоглобіном). Перевага цих методів у тому,  
що вони досить чутливі, дозволяють визначати  
оксид азоту в життєздатному матеріалі. Але ці ме-  
тоди потребують значних матеріальних витрат для  
технічного оснащення лабораторій, до того ж вони  
складні. Крім того, іонометричні методи передба-  
чають використання іоноселективних електродів,  
які не зручні в умовах культивування клітинних  
культур.

Для виявлення стабільних метаболітів оксиду  
азоту у гомогенаті, сечі, плазмі використовують  
спектрофотометричні методи. До них відносять,  
наприклад, сорбційно-спектрофотометричні, які  
засновані на сполученні сорбційного комплексу  
сполук на пінополіуретанах з подальшим їх визна-  
ченням безпосередньо у фазі сорбенту за допомо-  
гою спектроскопії [Дмитриенко С.Г., Золотов Ю.А.  
Пенополиуританы в химической диагностике раз-  
личных веществ и её аналитическое применение //  
Успехи современной химии. - 2002. -№2. -С.180-  
197]. Але ця методика використовується лише для  
визначення нітратів і нітритів у воді, рослинах і  
ґрунті.

Для визначення нітритів використовують діа-  
зотування на основі реакції Грісса, але нітрати при  
цьому не реєструються. Тому нітрати повинні бути  
відновлені до нітритів, з подальшим діазотуван-  
ням [Green L.C., Wagner D.A., Glogowski J. et al.  
Analysis of nitrate, nitrite and ( $^{15}\text{N}$ ) nitrate in biological  
fluids // J. Anal. Biochem. - 1982. - №126. -P.131-  
138; Деклараційний патент України №31600А. Ко-  
цюба А.В., Семиконна Т.В., Вікторов О.П. та ін.  
Бюл. №7 від 15.12.2000р.]. Відновлення нітратів до  
нітритів можна здійснити за допомогою таблетки-  
редуктора на основі пінополіуретану з поверхнею,  
закритою цинковим пилом, але це потребує спеці-  
альної обробки, та методика займає значний час.  
При використанні кадмію його гранули також по-  
требують спеціальної обробки та після аналізу

(13) **U**

(11) **24577**

(19) **UA**

повинні бути регенеровані.

Використання методу з азотнокислого редуказою потребує багато коштів і часу [Patton C.G., Fischer A.E., Campbell W.H. Corn leaf nitrate reductase - a nontoxic alternative to cadmium for photometric nitrate determinations in water samples by air-segmented continuous-flow analysis // Environmental Science & Technology. - 2002. - №36. - P.729-735].

Досить досконало вирішується проблема визначення вмісту нітритів і нітратів у діалізатах тканин за допомогою реактиву Грісса методом Гріна в модифікації О.А.Орлової [Орлова Е.А. Анализ нитратов и нитритов в ткани при экспериментальной острой почечной недостаточности // Украинский журнал экстремальной медицины. - 2002. - Т.3. - №1. - С.79-82]. Цей спосіб найбільш ефективний з існуючих і тому обраний нами в якості прототипу. Але даний спосіб використовується лише для тканин і біологічних рідин, а також потребує досить значної кількості реактивів.

Метою корисної моделі було створення способу визначення вмісту стабільних метаболітів оксиду азоту в культурі клітин.

Поставлене завдання вирішується тим, що мононуклеарні клітини попередньо культивують протягом 24, 48 і 72 години та до 1мл діалізату клітин додають 0,1 мл реактиву Гріса, а до 0,5мл діалізату додають 0,03г реактиву на основі цинкового пилу. Запропонований спосіб дозволяє визначити вміст оксиду азоту в культурі клітин, не потребує додаткових витрат на устаткування та оснащення, а також простий в постанові та не займає значного часу.

Дослідження проводиться з використанням культури мононуклеарних клітин, наприклад здорових донорів. Клітини культивують у середовищі Ігла МЕМ з додаванням L-глутаміну, 10% ембріональної телячої сироватки та антибіотиків при 37°C. Концентрацію клітин визначають у камері Горяєва та повним середовищем доводять до  $2 \times 10^6$  клітин на 1мл. Життєздатність виділених клітин оцінюють за даними тесту з трипановим синім. Клітини культивують 24, 48 і 72 години. Оскільки ми маємо тільки клітини, без залишкової тканини, після культивування клітини гомогенізують

в 1мл розчину, що є в 10 разів менше ніж при визначенні нітратів і нітритів в тканинах. Проводять діаліз протягом 2 годин, після чого в пробах проводять осадження білків 5% розчином КОН і 5% розчином сульфату цинку в об'ємному співвідношенні 2:5. Потім для визначення вмісту нітритів відбирають 1мл діалізату, а для нітратів - 0,5мл останнього.

Для визначення вмісту нітритів, оскільки для дослідження беруть 1мл діалізату, усі реактиви зменшують в 10 разів, тобто додають 0,1мл реактиву Грісса, пробірки струшують 2 хвилини та залишають при температурі 4°C на 13 хвилин, у результаті чого в пробах розвивається рожеве забарвлення. Вимірювання оптичної щільності проводять на СФ-46 при  $\lambda=540\text{nm}$ .

Для визначення вмісту нітратів, також реактиви зменшують в 10 разів та до 0,5мл діалізату додають 0,03г реактиву на основі цинкового пилу (сульфат барію - 100г, сульфат марганцю - 10г, цинковий пил - 2г, лимонна кислота - 75г, сульфанилова кислота - 4г, альфа-афтиламін - 2г) та 5мл оцтової кислоти. Реакцію проводять в аналогічних умовах протягом 10 хвилин. Проби центрифугують, відбирають супернатант. Вимірювання оптичної щільності проводять проти холостої проби на СФ-46 при  $\lambda=540\text{nm}$ .

Концентрації стабільних метаболітів оксиду азоту розраховують за формулою:

$$\frac{(\text{NO}_2^-)}{(\text{NO}_3^-)} = \frac{B \times X_1}{A \times X_2},$$

де:

B - вміст нітрит-аніонів (нітрат-аніонів), розрахований за калібрувальними кривими в  $\mu\text{M}$ ;

A - об'єм зразку в мл;

$X_1$  - загальний об'єм фільтрату в мл;

$X_2$  - об'єм фільтрату, взятий на аналіз в мл (1,0 або 0,5 відповідно).

Таким чином, запропонований спосіб є оптимальним для визначення вмісту стабільних метаболітів оксиду азоту в культурах клітин при різних строках культивування.