



УКРАЇНА

(19) UA (11) 48291 (13) U  
(51) МПК (2009)  
G01N 33/48  
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 МЕТАБОЛІТІВ ОКСИДУ АЗОТУ У СИРОВАТЦІ КРОВІ

1

(21) u200910081

(22) 05.10.2009

(24) 10.03.2010

(46) 10.03.2010, Бюл.№ 5, 2010 р.

(72) КОЗАР ВАЛЕНТИНА ВІКТОРІВНА, КУДРЯ  
МАРІЯ ЯКІВНА, УСТЕНКО НОННА ВАСИЛІВНА,  
НІКІШИНА ЛЮДМИЛА ЄВГЕНІВНА, КРАВЧЕНКО  
СВІТЛАНА ВІКТОРІВНА

(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ПРО-  
БЛЕМ ЕНДОКРИННОЇ ПАТОЛОГІЇ ІМ. В.Я. ДАНИ-

2

ЛЕВСЬКОГО АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇ-  
НИ" (ДУ ІПЕП)

(57) Спосіб визначення вмісту метаболітів оксиду азоту в сироватці крові за допомогою спектрофотометричного методу, який відрізняється тим, що як розчинник стандартів та досліджуваних проб застосовують воду дистильовану, як реагент використовують N-1-нафтилетилендіамін, реакцію проводять при температурі +4°C, а оптичну щільність аналітів вимірюють при довжині хвилі 536нм.

Корисна модель відноситься до медицини, ветеринарії та біології, і може бути використана для оцінки нітрозивного статусу організму.

Метаболіти оксиду азоту (нітрити та нітрати) є одними із медіаторів внутрішньоклітинної та міжклітинної взаємодії, відносяться до основних регуляторів нормальної функції ендотелію, серцево-судинної, імунної та інших систем [1]. Біологічні ефекти метаболітів оксиду азоту можуть носити як позитивний (регуляторна дія на судинний тонус, адгезію клітин, проникливість судин; захисна дія в якості чинника антиоксидантної активності, інгібіція адгезії лейкоцитів, захист від токсичної дії TNF- $\alpha$  тощо), так і негативний (пошкоджуюча дія відносно структури ДНК, індукція процесів перекисного окиснення ліпідів, пригнічення активності ряду ферментів, зниження антиоксидантного потенціалу клітин тощо) характер [2, 3]. Участь метаболітів оксиду азоту в контролі багатьох функцій і біохімічних процесів клітин і систем організму спонукає до пошуку ефективних, легко відтворюваних, чутливих методів визначення їх рівня в біологічних субстратах.

Для визначення метаболітів оксиду азоту на сьогодні запропоновано багато методів. Серед них спосіб кількісного визначення нітрит-аніону в біологічній рідині [4], метод визначення нітри-та/нітрата (NOx) в сироватці крові [5], спосіб оцінки тяжкості гестозу [6]. Недоліками вказаних методів є недостатня чутливість. Окрім цього важливим фактором, який стримує їх широке застосування, є

нестабільність реакційних сумішей для визначення нітратів, що обмежує в часі виконання методики.

Найбільш близьким до розробленого є спосіб, суть якого полягає у тому, що для визначення кількості нітрат-іонів використовується суміш барію сірчаноокислого, цинкового пилу, сульфату марганцю, лимонної кислоти, сульфанілової кислоти, альфа-нафтиламіна [7]. Оптична щільність розчинів вимірюється при довжині хвилі 540нм.

До недоліків цього способу можна віднести недостатню чутливість, яка спричинена вимірюванням оптичної щільності на довжині хвилі, що не відповідає максимальному поглинанню та недотриманням оптимальних режимів при виборі температури [8]. Крім того, у способі застосовується альфа-нафтиламін, який є канцерогеном, а використання барію сірчаноокислого призводить до виникнення мутності, для осаду якої необхідно застосовувати центрифугування.

Задача корисної моделі - розробка оптимізованого способу визначення метаболітів азоту в сироватці крові.

Поставлена задача вирішується тим, що для визначення вмісту метаболітів оксиду азоту в сироватці крові спектрофотометричним методом в якості розчинника стандартів та досліджуваних проб застосовують воду дистильовану, в якості реагента використовують N-1-нафтилетилендіамін, реакцію проводять при температурі +4°C, а оптичну щільність вимірюють при довжині хвилі 536нм.

(13) U  
(11) 48291  
(19) UA

Технічний результат - підвищення точності кількісної оцінки вмісту метаболітів оксиду азоту в сироватці крові.

У розробленому способі у суміші для відновлення нітратів до нітритів не застосовують бар'єр сірчано-кислий, що зменшує час проведення реакції; після виконання усіх етапів реакції для визначення загальних метаболітів оксиду азоту немає жорстких обмежень у часі, що дозволяє провести вимірювання оптичної щільності не чітко через 30 хвилин, а навіть через декілька годин; оптичну щільність розчинів вимірюють при довжині хвилі, при якій згідно із знятого спектру розчину спостерігали максимальне поглинання; після визначення оптичної щільності проб концентрацію аналітів розраховують по стандартним розчинам, використовуючи коефіцієнт регресії [9].

Запропонований спосіб здійснюється таким чином. Досліджувану сироватку попередньо звільняють від глобулінів та альбумінів, для чого до 0,5мл сироватки додають спочатку 0,5мл 6% розчину  $ZnSO_4$ , ставлять на холод на 10 хвилин, потім додають 0,5мл 0,5N розчину  $NaOH$  і знову ставлять на холод на 15 хвилин, помішуючи через кожні 5 хвилин. Після цього пробу центрифугують 20 хвилин при 4000об/хв. Надосадову рідину (супернатант) відбирають у чисту хімічну пробірку, усі проби повинні бути закриті пробками у зв'язку з тим, що метаболіти азоту є летючими сполуками.

Для визначення вмісту метаболітів оксиду азоту (суми нітрит-іонів та відновлених до нітритів нітрат-іонів) в суху чисту пробірку вносять 30мг суміші, яка містить цинкового пилу (2г), сульфату марганцю (10г), лимонної кислоти (75г), сульфатнілової кислоти (4г), N-1-нафтилетилендіаміну (2г), додають 0,5мл супернатанту, потім додають 0,5мл води дистильованої, закривають пробками. Струшують пробірки 2 хвилини, потім ставлять на 10 хвилин на холод (+4°C). Після цього проби витримують при кімнатній температурі 15-20 хвилин і вимірюють оптичну щільність (Y) на спектрофотометрі за довжини хвилі 536нм проти води дистильованої.

Паралельно вимірюють за тих же умов оптичну щільність градуовального розчину, утвореного додаванням тих же реактивів до розчину калію азотнокислого ( $KNO_3$ ) з вмістом  $NO_3^-$  від 0 до 150мкмоль/л. Розраховують параметри рівняння регресії:

$$Y=A+BX,$$

де Y - оптична щільність градуовальних розчинів,

X - концентрація градуовальних розчинів, мкмоль/л,

A - вільний член,

B - коефіцієнт регресії.

Вміст метаболітів оксиду азоту у пробі, що досліджують, розраховують за рівнянням:

$$X_1=(Y_1-A)/B$$

де  $Y_1$  - оптична щільність досліджуваної проби,

B - коефіцієнт регресії, розрахований за результатами градуовальних розчинів,

A - вільний член, розрахований за результатами градуовальних розчинів.

Суть корисної моделі ілюструється прикладом її конкретного застосування. Вміст метаболітів оксиду азоту визначали у сироватці крові інтактних половозрілих самиць-щурів. Значення показників знаходилися у межах від 12,5мкмоль/л до 31,9мкмоль/л.

Наші дані співпадають з даними інших авторів. Так, наприклад, в роботі [10] було показано, що в контрольній групі пацієнтів в середньому вміст метаболітів азоту складав  $23,4 \pm 1,6$  мкмоль/л. За даними авторів [11] у сироватці контрольної групи здорових людей рівень нітратів + нітритів знаходився у межах  $14,4 \pm 3,6$  мкмоль/л.

Таким чином, використання запропонованого способу для кількісної оцінки метаболітів оксиду азоту у сироватці крові є адекватним біологічним тестом.

Література:

1. Suzuki H., Menegazzi M., Carcereri de Prati A., Mariotto S., Armato U. Nitric oxide in the liver: physiopathological roles // *Adv. Neuroimmunol.* - 1995. - Vol.5, N.4. - P.379-410.

2. Mitaka C, Yokoyama K, Imai T. Nitric oxide production is more prominent in off-pump than in on-pump coronary artery bypass surgery // *Anaesth Intensive Care.* - 2007. - V.35, N4. - P.505-509.

3. Koch A., Zacharowski K, Boehm O, Stevens M, Lipfert P, von Giesen HJ, Wolf A, Freynhagen R. Nitric oxide and pro-inflammatory cytokines correlate with pain intensity in chronic pain patients // *Inflamm Res.* - 2007. - V.56, N1. - P.32-37.

4. Пат.98095152 UA, МПК А 31600 (1998.09), G01N33/52 (1998.09). Спосіб кількісного визначення нітрит-аніону в біологічній рідині / Коцюруба А.В., Семикопна Т.В., Вікторов О.П., Мітченко О.І., Буханевич О.М., Гула Н.М. (UA); заяви. Український науково-дослідний інститут кардіології ім. М.Д. Стражеско.

5. Метод определения нитрита/нитрата ( $NO_x$ ) в сыворотке крови / П.П. Голиков, Н.Ю. Николаева // *Биомедицинская химия: Научно-практический журнал / НИИ биомедицинской химии РАМН (Москва).* - 2004. - Том 50, N 1. - С.79-85.

6. Пат. 2309412 RU, МПК G01N33/84 (2006.01), G01N33/68 (2006.01). Способ оценки степени тяжести гестоза / Орлов А.В., Крукиер И.И., Погорелова Т.Н., Друккер Н.А., Афонина Т.А. (RU); заявитель ФГУ "Ростовский НИИ акушерства и педиатрии РОСЗДРАВА (RU). №2006101754/15; заявл. 2006.01.23; опубл. 2007.10.27. - Режим доступа: [http://www.ntpo.com/patents\\_medicine/](http://www.ntpo.com/patents_medicine/).

7. Методика определения нитратов и нитритов в кормах, овощах, бахчевых культурах, крови, патологическом материале, молоке и молочных продуктах / Утв. главным управлением ветеринарии Госагропрома СССР 18 июня 1986 г. - М., 1986. - 7с.

8. Г. Шарло. Методы аналитической химии / М.: Химия, 1969. - 1204с.

9. Фотометрический метод определения нитратов и нитритов в биологических жидкостях: инструкция по применению / МЗ Республики Беларусь, 19 марта 2001 г., рег. № 91-0008. - Витебск, 2001. - 9с.

10. Невзорова В.А., Захарчук Н.В., Плотникова И.В. Блокаторы медленных кальциевых каналов в предупреждении цереброваскулярных катастроф // Неврология. - 2007. - Т.9, №8. - С.14-17.

11. Inan N., Yilmaz G., Surer H., Coskun O., Ucler S., Cavdar L., Inan L.E. Is there a role for nitric oxide activity in cervicogenic headache? // Funct Neurol. -2007. - Vol.22, N.3. - P.155-157.