



УКРАЇНА

(19) UA (11) 41003 (13) A

(51) 7 G01N33/48, 33/52

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ОКСИДУ АЗОТУ

(21) 2000127587

(22) 27.12.2000

(24) 15.08.2001

(46) 15.08.2001, Бюл. № 7, 2001 р.

(72) Поливода Сергій Миколайович, Черепок Олександр Олексійович, Войтович Олександр Васильєвич

(73) ПОЛИВОДА СЕРГІЙ МИКОЛАЙОВИЧ, ЧЕРЕПОК ОЛЕКСАНДР ОЛЕКСІЙОВИЧ, ВОЙТОВИЧ ОЛЕКСАНДР ВАСИЛЬЄВИЧ

(57) Спосіб визначення оксиду азоту, що полягає у визначенні його кінцевих метаболітів в крові, кон-

версії кінцевих метаболітів оксиду азоту до нітрит-іону, утворенні забарвлених продуктів реакції між кінцевими метаболітами оксиду азоту та реактивом Griess, реєстрації світлопоглинання реакційної суміші за допомогою спектрофотометру та визначенні вмісту оксиду азоту по калібрувальній кривій, який **відрізняється** тим, що проводять депротейнізацію сироватки крові за допомогою розчину сульфату цинку стандартним шляхом, конверсію кінцевих метаболітів оксиду азоту до нітрит-іону здійснюють шляхом додавання до депротейнізованої сироватки металічного кадмію.

Винахід стосується медицини, а саме лабораторної діагностики, і може бути використаний для визначення оксиду азоту у хворих з патологією внутрішніх органів.

Основним вазорегуючим чинником, який продукується судинним ендотелієм, є оксид азоту. Оксид азоту здатний модулювати функціональну активність секреторних клітин та органів, на молекулярному рівні оксид азоту і його похідні беруть участь у процесах трансляції і транскрипції стрес білків, феритину, білків антиоксидантного захисту, антионкогенного білка p53 і ін. Але основними ефектами оксиду азоту є підтримання структури та функції судинної стінки через його здатність активувати розчинну форму гуанілатциклази внаслідок зв'язування оксиду азоту з її простетичною гемовою групою. Гуанілатциклаза сприяє утворенню вторинного месенжера - циклічного ГМФ, якому власне і придатні вазоділатуючі властивості, які реалізуються за допомогою модуляції активності кальцієвих каналів у гладенько м'язових клітинах. Враховуючи важливу і багатогранну роль оксиду азоту в підтримці гомеостазу серцево-судинної системи як у нормі, так і при розвитку різних патологічних станів, існує нагальна потреба визначення оксиду азоту. Але існуючі способи його визначення характеризуються незначною точністю, достовірністю та відтворюваністю результатів дослідження, що лімітується як надзвичайно коротким періодом напіврозпаду цієї молекули, так і не зовсім адекватними методичними прийомами, покладеними в основу методів визначення оксиду азоту.

Відомий спосіб визначення оксиду азоту, що полягає у наступному:

1. Вміст оксиду азоту визначають за вмістом його кінцевих метаболітів в крові.

2. Проводять депротейнізацію сироватки крові за допомогою сульфосаліцилової кислоти.

3. Для розвитку реакції з утворенням забарвлених продуктів, обумовлених кінцевими метаболітами оксиду азоту, депротейнізовану сироватку змішують з розчином реактиву Griess.

4. Реєструють світлопоглинання реакційної суміші за допомогою спектрофотометру.

5. По калібровочній кривій знаходять вміст кінцевих метаболітів оксиду азоту. (Ito A., Egashira K., Kadokami T. et al. Chronic Inhibition of Endothelium-Derived Nitric Oxide Synthesis Causes Coronary Micro vascular Structural Changes and Hyperreactivity to Serotonin in Pigs. //Circulation.-1995.-Vol. 92.-P. 2636-2644).

Суттєвим ознаками аналогу і винаходу, що збігаються, є такі:

1. Визначення вмісту оксиду азоту по його кінцевим метаболітам в крові.

2. Депротейнізація сироватки крові.

3. Утворення забарвлених продуктів реакції між кінцевими метаболітами оксиду азоту та реактивом Griess.

4. Реєстрація світлопоглинання реакційної суміші за допомогою спектрофотометру.

5. Визначення вмісту оксиду азоту по калібровочній кривій.

Не зменшуючи значення вказаного способу, слід помітити, що у вказаних вище умовах буде визначатися тільки лише вміст у крові одного з проміжних метаболітів оксиду азоту - нітрит іона, тому що компоненти реактиву Griess здатні вступати в реакцію з утворенням забарвлених продуктів лише з нітрит іонами. Однак вміст нітрит іонів у сироватці крові недостатньо корелює із вмістом оксиду азоту, тому що нітрит іон здатний піддаватися подальшому окислюванню в нітрат іон, який не буде визначатися в зазначених умовах, так що не враховується при остаточному визначенні оксиду азоту за допомогою цього способу і приводить до значного заниження результатів визначення оксиду азоту.

Найбільш близьким за технічною суттю та досягаємому результату є спосіб визначення оксиду азоту, що полягає в наступному:

1. Вміст оксиду азоту визначають за вмістом його кінцевих метаболітів в крові.

2. До розбавленої сироватки додають буферний розчин, який містить імідазол, NADPH, флавінаденідинуклеотид.

3. З метою конверсії кінцевих метаболітів оксиду азоту до нітрит іону до реакційної суміші додають нітритредуктазу, отриману із *Aspergillus niger*.

4. Проводять депротейнізацію реакційної суміші за допомогою сульфосаліцілової кислоти.

5. Для розвитку реакції з утворенням забарвлених продуктів, обумовлених кінцевими метаболітами оксиду азоту, депротейнізовану реакційну суміш змішують з розчином реактиву Griess.

6. Реєструють світлопоглинання реакційної суміші за допомогою спектрофотометру.

7. По калібровочній кривій знаходять вміст оксиду азоту. (Rosselli M., Imthurn B., Keller P.J. et al. Circulating Nitric Oxide (Nitrite/Nitrate) Levels in Postmenopausal Women Substituted With 17 - Estradiol and Norethisterone Acetate. A Two-Year Follow-up Study // Hypertension.-1995.-Vol. 25.-P. 848-853) Спільними істотними ознаками прототипу і способу, що заявляється є:

1. Визначення вмісту оксиду азоту по його кінцевим метаболітам в крові.

2. Конверсія кінцевих метаболітів оксиду азоту до нітрит іону.

3. Утворення забарвлених продуктів реакції між кінцевими метаболітами оксиду азоту та реактивом Griess.

4. Реєстрація світлопоглинання реакційної суміші за допомогою спектрофотометру.

5. Визначення вмісту оксиду азоту по калібровочній кривій.

Однак при визначенні оксиду азоту зазначеним методом потрібна стандартизація кожної партії ферменту, який використовується, по його ферментативній активності, що значно ускладнює процедуру проведення дослідження і знижує точність, а особливо відтворюваність одержуваних результатів. Це обумовлено тим, що концентрації ферменту, які використовуються, мізерно малі, що збільшує погрішність при його дозуванні, а готування розчину нітритредуктази про запас неможливо через прогресуючу з часом втрату біологічної активності ферменту; заморожування ж розчину ферменту (що звичайно застосовується в лабора-

торній практиці) також приводить до зменшення його відновлювальної здатності. А саме від повноти конверсії нітрат іона в нітрит іон, що і здійснюється за допомогою нітритредуктази, і буде залежати точність визначення оксиду азоту, тому що наступна взаємодія нітрит іона з компонентами реактиву Griess, від якої і залежить кількість забарвлених продуктів, що утворюються, здійснюється прямо пропорційно вмісту нітрит іона в реакційній суміші.

В основу винаходу поставлено завдання удосконалення способу визначення оксиду азоту шляхом зміни методики проведення деяких етапів лабораторного дослідження, що дозволить підвищити точність, достовірність та відтворюваність результатів.

Поставлене завдання вирішується тим, що в способі визначення оксиду азоту шляхом визначення його кінцевих метаболітів в крові, конверсії кінцевих метаболітів оксиду азоту до нітрит іону, утворенні забарвлених продуктів реакції між кінцевими метаболітами оксиду азоту та реактивом Griess, реєстрації світлопоглинання реакційної суміші за допомогою спектрофотометру та визначенні вмісту оксиду азоту по калібровочній кривій, новим є те, що проводять депротейнізацію сироватки крові за допомогою розчину сульфату цинку стандартним шляхом, конверсію кінцевих метаболітів оксиду азоту до нітрит іону здійснюють шляхом додавання до депротейнізованої сироватки металічного кадмію.

Прийчинно-наслідковий зв'язок між сукупністю ознак, що заявляються, та технічним результатом полягає в наступному: для вивчення вмісту оксиду азоту користуються рядом методичних прийомів, та як в тканинах та крові оксид азоту метаболізується до кінцевих, стійких продуктів, таких як нітрат іон (NO_3) і нітрит іон (NO_2), вміст цих речовин у сироватці крові буде прямо пропорційний продукції в організмі оксиду азоту. Інших ендогенних джерел утворення нітрат і нітрит іонів в організмі людини не існує, з екзогенних факторів, що можуть вплинути на вміст зазначених речовин у крові, варто виключити вживання обстежуваними особами зелених та ранніх овочів (перо цибулі, шпинат, листя салату, щавель, тепличні огірки й ін.) у яких можуть міститись домішки нітратів, які надходять з ґрунту, чи вносяться у вигляді добрив, що можна зробити досить просто при дотримання обстежуваними особами стандартизованої дієти протягом дня, що передус обстеженню. Кінцевим продуктом метаболізму оксиду азоту в крові є нітрат іон, тому що після утворення нітрит іона, останній швидко, протягом декількох десятків секунд окислюється до нітрат іона. Тому визначення тільки лише нітрит іону в крові для оцінки ступеня продукції судинним ендотелієм оксиду азоту не є доцільним, тому що його концентрація мало залежить від вмісту оксиду азоту, а визначається ступенем активності окисидантних та антиоксидантних систем крові. Використання металевого кадмію дозволяє цілком відновити нітрат іон, що міститься в сироватці крові, у нітрит іон, який потім може бути визначений за допомогою відомих аналітичних методів. У такий спосіб визначення оксиду азоту, що здійснюється шляхом визначення вмісту в крові кінцевих продуктів його метаболізму

з повною конверсією нітрат іона в нітрит іон дозволяє провести цю процедуру з високим ступенем точності, достовірності та відтворюваності результатів дослідження. Використання в якості депротейнізуючої речовини сульфату цинку дозволяє цілком звільнити реакційне середовище від білків сироватки крові, які могли б зменшити відновлювальну здатність гранул кадмію через сорбцію на його поверхні, а присутність домішки іонів цинку в реакційному середовищі ще більш підсилює відновлювальну здатність металевого кадмію, служачи при цьому каталізатором реакції відновлення нітрат іона до нітрит іона. Наступне визначення нітрат іона здійснюється за допомогою колориметричної реакції його з реактивом Griess, в основі якої лежить утворення забарвлених продуктів між компонентами реактиву Griess (альфа-нафтилацетат та сульфанілова кислота) і нітрит іоном у кислому середовищі, причому ступінь забарвлення реакційної суміші прямо пропорційна вмісту нітрит іонів. У такий спосіб застосування зазначених методичних прийомів значно підвищує точність, достовірність та відтворюваність методу визначення оксиду азоту.

Для визначення показника норми було обстежено 43 практично здорових осіб. Серед обстежених здорових осіб були представлені різні вікові групи (згідно рекомендацій ВООЗ), середній вік склав $41,4 \pm 12,3$ року, жінок було 18 (41,86%), чоловіків - 25 (58,14%). Після обчислення результатів обстеження групи здорових осіб вміст оксиду азоту склав $51,04 \pm 1,54$ мкмоль/л.

Спосіб здійснюється таким чином:

1. Шляхом венепункції набирають у пробірку декілька мілілітрів крові та отримують сироватку крові стандартним шляхом.
2. Вміст оксиду азоту визначають за вмістом його кінцевих метаболітів в крові.
3. Проводять депротейнізацію сироватки крові за допомогою розчину сульфату цинку стандартним шляхом.
4. З метою конверсії кінцевих метаболітів оксиду азоту до нітрит іону до депротейнізованої сироватки додають металічний кадмій.
5. Відділяють осад кадмію від депротейнізованої сироватки.
6. Для розвитку реакції з утворенням забарвлених продуктів, обумовлених кінцевими метаболітами оксиду азоту, депротейнізовану сироватку змішують з розчином реактиву Griess.
7. Реєструють світлопоглинання реакційної суміші за допомогою спектрофотометру.
8. По калібровочній кривій знаходять вміст оксиду азоту.

Приклад: Хворий С., 43 років, надійшов в кардіологічне відділення Запорізької обласної клінічної лікарні з скаргами на запаморочення, головний біль, «мільтішиння цяток» перед очима, дзвін в вухах, задишку при фізичному навантаженні. Вважає себе хворим протягом 8 років, коли вперше, без видимої причини, було зареєстровано нову кровотечу, яка супроводжувалася підвищенням артеріального тиску до 190/120 мм рт.ст. Згодом хворий неодноразово знаходився на стаціонарному лікуванні з приводу гіпертонічної хвороби, одержував амбулаторну терапію β -блокаторами і

діуретиками. За тиждень до надходження в клініку, після сильного психоемоційного потрясіння, з'явилися вищезазначені скарги на тлі високих цифр артеріального тиску (до 180/110 мм рт.ст.), і хворий був госпіталізований для купірування гіпертонічного криза та корекції проводимої терапії. Анамнез життя - без особливостей, мати хворого страждала гіпертонічною хворобою, іншої спадкової патології в родині не виявлено. Пацієнт палить протягом 13 років, інші шкідливі звички заперечує, алергологічний анамнез не обтяжений. Об'єктивно спостерігаються наступні зміни. Артеріальний тиск в момент надходження 180/100 мм рт.ст. на лівій і 185/110 мм рт.ст. на правій плечових артеріях, пульс 84 ударів в хвилину, задовільних властивостей. При пальпації верхівний поштовх визначається на 2-2,5 см ззовні від середньоключичної лінії з лівої сторони в 6 міжребер'ї, поширений, збільшений по висоті, посилений. Перкуторно - розширення границь відносної серцевої тупості, аускультативно - діяльність серця правильна, посилений I тон на верхівці серця, в легенях дихання везикулярне, жорсткувате, в нижніх відділах з обох сторін одиничні вологі дрібнобульбасті неконсонуючі хрипи. Частота дихання 20 в 1 хвилину, дихання поверхневе. На електрокардіограмі - ознаки гіпертрофії міокарда лівого шлуночка, порушення процесів реполяризації в лівих грудних відведеннях. При ехокардіографічному дослідженні спостерігається збільшення кінцеводіастолічного і кінцевосістолічного об'ємів лівого шлуночка, помірне зниження його скорочувальних властивостей, потовщення задньої стінки лівого шлуночка та міжшлуночкової перетинки, наявна гіпертрофія міокарда лівого шлуночка (індекс маси міокарда лівого шлуночка 123 г/м^3). При рентгенологічному дослідженні в легенях посилений судинний малюнок, корені структурні, тяжисті, більше з правої сторони. При дослідженні очного дна визначається звуження і склерозування артерій, вени повнокровні, поширені, феномен Салюса-Гуна II-III ступеня. Дані інших інструментальних та лабораторних досліджень без особливостей. Враховуючи скарги хворого, клінічну картину захворювання, дані об'єктивного дослідження і зважаючи на результати додаткових способів дослідження, хворий був поставлений клінічний діагноз - Гіпертонічна хвороба, II стадія. Враховуючи часту асоціацію порушення функції ендотелію із зменшенням вмісту оксиду азоту з підвищенням артеріального тиску та з метою оптимізації застосовуємо протигіпертензивної терапії, у хворого була визначений вміст оксиду азоту згідно пропонуємого способу. Сироватка була отримана загальноприйнятим способом, депротейнізація була проведена за допомогою розчину сульфату цинку стандартним шляхом. Для розвитку реакції з утворенням забарвлених продуктів, обумовлених кінцевими метаболітами оксиду азоту, депротейнізовану сироватку було змішано з розчином реактиву Griess та зареєстровано світлопоглинання реакційної суміші за допомогою спектрофотометру з наступним визначенням оксиду азоту по калібровочній кривій. Результати аналізу свідчили, що вміст оксиду азоту склав 10,2 мкмоль/л. Такий низький вміст оксиду азоту не притаманний людині ні в нормі, ні при гіпертонічній хворобі. Тобто визначення вмісту оксиду азоту бу-

ло хибним, що могло би привести до помилкового діагнозу у досліджуємого. Одночасно з вищезгаданим способом, було проведено визначення вмісту оксиду азоту згідно способу, що пропонується, після конверсії кінцевих метаболітів оксиду азоту до нітриту іону. За результатами аналізу вміст оксиду азоту склав 35,44 мкмоль/л, що свідчило про зменшення продукції оксиду азоту судинним ендотелієм у даного хворого. Таким чином використання запропонованого способу визначення оксиду азоту дозволило попередити діагностичну помилку і сприяло покращенню процесу лікування хворого з використанням ендотелій-протекторних препаратів. Через 12 тижнів комплексного лікування, при контрольному обстеженні поряд з поліпшенням

клінічної картини захворювання та позитивною динамікою даних інструментальних досліджень, спостерігалось достовірне збільшення вмісту оксиду азоту, вміст якого згідно запропонованого способу склав 50,17 мкмоль/л. Таким чином, використання способу, що пропонується, дозволило вчасно визначити ступінь залученості ендотеліальних клітин в патологічні процеси при гіпертонічній хворобі, попередило хибне визначення наявності та ступеня вираженості зрушень в системі метаболізму оксиду азоту, дозволило призначити патогенетично зумовлену терапію, що в підсумку призвело до підвищення якості діагностики, дозволило оптимізувати лікування і відвернути появу ускладнень.

Тираж 50 екз.

Відкрите акціонерне товариство «Патент»
Україна, 88000, м. Ужгород, вул. Гагаріна, 101
(03122) 3 – 72 – 89 (03122) 2 – 57 – 03

41003