



УКРАЇНА

(19) UA (11) 45158 (13) A

(51) 7 C01B21/24,G01N33/50

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДВИДАЄТЬСЯ ПІД
ВІДПОВІДАЛЬНІСТЬ
ВЛАСНИКА
ПАТЕНТУ

(54) ПРИСТРІЙ ДЛЯ ОТРИМАННЯ І ДОЗОВАНОЇ ПОДАЧІ ОКСИДУ АЗОТУ NO І ПОБУДОВИ КРИВИХ ДИСОЦІАЦІЇ ОКСИГЕМОГЛОБІНУ В ПРИСУТНОСТІ NO

1

2

(21) 2001063807

(22) 06 06 2001

(24) 15 03 2002

(46) 15 03 2002, Бюл. № 3, 2002 р.

(72) Коробов В'ячеслав Миколайович, Федорович Андрій Миколайович, Соколик Наталія Василівна

(73) ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ІВАНА ФРАНКА

(57) 1 Пристрій для отримання і дозованої подачі оксиду азоту NO і побудови кривих дисоціації оксигемоглобіну в присутності NO, що містить синтезуючий вузол, який відрізняється тим, що додатково має дозууючий вузол, вузол для деоксигенації рідин і їх вимірювання і вузол для контролю вакууму і дозованої подачі повітря, причому усі вузли з'єднані між собою скляними шліфами або вакуумними шлангами з вакуумними кранами і переходниками

2 Пристрій по п. 1, який відрізняється тим, що синтезуючий вузол складається з об'єму для розчину аскорбінової кислоти і об'єму для кристалів NaNO_2 , з'єднаних між собою склянкою трубкою, причому ко-

жний об'єм має завантажувальний отвір

3 Пристрій по п. 1, який відрізняється тим, що дозууючий вузол має змінний об'єм за рахунок розміщення в ньому скляних кульок і за допомогою двоходового вакуумного крана з'єднаний з U-подібним скляним манометром, який заповнений забарвленою дистильованою водою, який через двоходові крани і перехідник з однієї сторони з'єднаний з триходовим краном, що пов'язаний вакуумними шлангами з вузлом для деоксигенації рідин і вимірювання, а з іншої сторони - з вузлом для контролю вакууму і дозованої подачі повітря

4 Пристрій по п. 1, який відрізняється тим, що вузол деоксигенації рідин і вимірювання містить об'єм для обміну газами і вимірювальну кварцеву кювету

5 Пристрій по п. 1, який відрізняється тим, що вузол для контролю вакууму і дозованої подачі повітря складається з мембранного вакуумметра, який через перехідник і двоходовий кран з'єднаний з форвакуумним насосом

Винахід відноситься до галузі медичного приладобудування і може бути використаним для визначення кисневодисоційних кривих гемоглобіну (Hb) і міоглобіну (Mb) в присутності оксиду азоту

Відомо, що оксид азоту в основному використовують у виробництві азотної кислоти. Сучасні методи виробництва азотної кислоти можуть бути розбиті на три основні групи отримання азотної кислоти при атмосферному тиску, при підвищеному тиску, комбінованим способом [В. И. Атрощенко, С. И. Каргин "Технология азотной кислоты" Изд-во "Химия", Москва, 1970 г. С. 196-239]

Оксид азоту можна отримати, якщо суміш аміаку з повітрям пропустити над каталізатором [К. Николаев "Общая и неорганическая химия" Изд. "Просвещение", Москва, 1974 г.]

$4\text{NH}_3 + 5\text{O}_2 = 4\text{NO} + 6\text{H}_2\text{O}$ Ця реакція широко використовується у промисловості для отримання азотної кислоти окисленням аміаку. Оскільки усі етапи перетворення аміаку до оксиду азоту перебігають на поверхні каталізатора, на всіх заводах

як каталізатор використовують сітку з платини або її сплави. Платинову сітку попередньо нагрівають, пропускаючи через неї електричний струм, температуру $\approx 900^\circ\text{C}$ підтримують за рахунок екзотермічної реакції окислення

Безпосереднє з'єднання азоту з киснем можливе лише при високих температурах, оскільки для реакції $\text{N}_2 + \text{O}_2 = 2\text{NO}$ зміна ізобарного потенціалу є від'ємною. Оксид азоту можна отримати при взаємодії азотної кислоти з міддю, однак така реакція проходить складно і, як правило, завжди отримують суміш NO і NO_2 . Схематично це виглядає так: $3\text{Cu} + 8\text{HNO}_3 = 2\text{NO} + 3\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 + 4\text{H}_2\text{O}$. Чистий оксид азоту можна отримати сплавленням нітратів і нітритів з окисом хрому

$3\text{KNO}_2 + \text{KNO}_3 + \text{Cr}_2\text{O}_3 = 2\text{K}_2\text{CrO}_4 + 4\text{NO}$ Виробництво азотної кислоти потребує дорогого обладнання і належного захисту працівників, а також навіколишнього середовища

Найбільш близьким за технічною суттю - про-

(13) A

(11) 45158

(19) UA

тотипом - є пристрій для отримання оксиду азоту і кінетики дисоціації нітрозогемоглобіну (HbNO) і карбоксигемоглобіну (HbCO), що був описаний в 1956 році вченими By Q H Gibson and F J W Roughton (The kinetics of dissociation of the first Hgand molecule from fully saturated carboxyhaemoglobin and nitric oxide haemoglobin in sheep blood solutions Proceedings of the royal society Biological Sciences Series B Vol 147 № 926 1956) Для отримання оксиду азоту NO у пристрої використана реакція дві концентрованої сірчаної кислоти на нітрит натрію, внаслідок якої отримували суміш двооксиду азоту NO₂ і оксиду азоту NO з наступним доочищенням суміші продуктів реакції, що вимагає складної і дорогої апаратури

Цей пристрій складається з реакційної колби, крапельної лійки, реометра, склянки з KOH, склянки з концентрованою H₂SO₄ пастки, посудини Дюара, колонки з п'ятиокисом фосфору, конденсаторів і скляних фільтрів (рис 1)

Отриманий і очищений NO у даному пристрої подається у тонометр за допомогою спеціального крану і в подальшому дозовано через систему кранів подається в сатуратор з кюветою для спектrophотометрії лігандних форм гемоглобіну

Недоліком цього пристрою є те, що він громіздкий по відношенню цілої низки складових цієї системи В пристрої застосовуються агресивні луги і концентровані кислоти Він вимагає додаткового доочищення оксиду азоту від різних домішок

В основу винаходу поставлено задачу вдосконалити пристрій для отримання і дозованої подачі оксиду азоту і побудови кривих оксигемоглобіну в присутності NO шляхом використання нових конструктивних рішень і технологій, що дозволить забезпечити швидке і якісне отримання кисневодисоційних кривих оксигемоглобіну і оксиміоглобіну в присутності NO

Поставлена задача вирішується так - у пристрої, який містить синтезуючий вузол, додатково є дозуючий вузол, вузол для оксигенації рідин і вимірювання, а також вузол для контролю вакууму і дозованої подачі повітря, причому усі з'єднані між собою скляними шліфами або вакуумними шлангами, вакуумними кранами і перехідниками синтезуючий вузол складається з об'єму для розчину аскорбінової кислоти і об'єму для кристалів NaNO₂, з'єднаних між собою скляною трубкою, причому кожний об'єм має завантажувальний отвір, дозуючий вузол має змінний об'єм за рахунок розміщення в ньому скляних купольок і за допомогою двоходового вакуумного крану з'єднаний з U- подібним скляним манометром, який заповнений забарвленою дистильованою водою, який через двоходові крани і перехідник з однієї сторони з'єднаний з трьохходовим краном, що пов'язаний вакуумними шлангами з вузлом для деоксигенації рідин і вимірювання, а з іншої сторони - з вузлом для контролю вакууму і дозованої подачі повітря, вузол деоксигенації рідин і вимірювання містить об'єм для обміну газами і вимірювальну кварцеву кювету, вузол для контролю вакууму і дозованої подачі повітря складається з мембранного вакуумметра, який через перехідник і двоходовий кран з'єднаний з фор-вакуумним насосом

Авторами вперше запропоновано використувати NO для побудови кривих дисоціації оксигемоглобіну

Аналізуючи характер розташування КДО гемоглобіну при 25, 50, 75% насиченні крові киснем автори зауважили, що нахил кривих оксигенації збільшувався зі зменшенням насичення крові киснем Це свідчить про те, що підсилюючи ефект Hb-NO на від'єднання кисню від молекули, гемоглобін стає сильнішим у периферичних ділянках кровотоку, де pO₂ низький При збільшенні pO₂ в альвеолах відбувається зміцнення шостого координаційного зв'язку і спорідненість гемоглобіну до кисню збільшується Таким чином NO додатково до вазодилататорної функції виконує роль регулятора транспортної функції кисню у дихаючій тканині через послаблення зв'язку атома заліза з проксимальним гістидином субодиниць Разом з тим, киснево-зв'язуюча функція гемоглобіну зберігається у зв'язку з можливістю зміцнення Fe-HIS зв'язку при підвищенні парціального тиску кисню у легенях Наявність нітрозо-протеїнів у крові забезпечує депонування NO що при певних критичних умовах виступає в ролі локального регулятора потоку O₂ в тканині

Регуляторна роль NO можлива лише при екзогенному утворенні його в кількості менше одного проценту від загального гемоглобіну Надмірне утворення NO небезпечне і негативно впливає на газотransпортну функцію крові, оскільки приєднання його до β-ланцюгів значно збільшує спорідненість гемоглобіну до кисню, одночасно накопичується метHb, що обмежує постачання кисню до тканин, що призводить до розвитку гіпоксичних станів і загибелі клітин

Утворення NO в надлишку може привести до продукції NO₂, при збільшенні pO₂ Це пов'язано з тим, що NO окислюється киснем до NO₂ 2NO + O₂ → 2NO₂, який при надлишку NO утворює 2NO + O₂ → 2N₂O₃ + N₂O₃ При взаємодії з водою утворює нітрит-іони 2N₂O₃ + 2H₂O → 2NO₂⁻ + 4H⁺

Утворений NO² може бути використаний мітохондріями в якості акцептора електронів, тобто клітини переходять з кисневого на нітратно-нітритне дихання Можливість переходу мітохондрій на такий тип дихання обговорюється в опяді Реутова В П Гемоглобін і міоглобін мають властивість відновлювати нітрит іони до окису азоту, вони замикають ланцюжок L-аргінін → NO → NC₂/NO₃ → NO в один цикл Властивість гемопротеїдів відновлювати нітрит-іони до NO проявляється лише в відновленому стані (цього сприяє дефіцит кисню) Кисень інгібує нітритредуктазну активність цих білків При гіпоксії нітритредуктазна активність гемопротеїнів збільшується, підсилюється також генерація NO з L-аргініну вміст якого в сироватці крові зменшується

Особливе фізіологічне значення в системі депонування NO має місце гемоглобін Утворення Hb-NO комплексів має такі шляхи утворення або в результаті взаємодії з швидко проникаючим NO утвореного в L-аргениновому шляху, або в результаті перетворення NO₂ самим дезоксигемоглобіном в NO Властивість гемоглобіну зв'язувати NO дає можливість транспорту цього газу на значні віддалі Важливо, що в цьому випадку NO може бути ви-

користане в системі міжорганичних взаємодій. Вивільняючи в умовах гіпоксії з комплексу HbNO оксид азоту, який може досягати мозку, міокарду і інших тканин, які потребують його в якості регулятора внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} . Відомо, що поступлення Ca^{2+} в клітини кровоносних судин при гіпоксії пригнічується. Це призводить до інгібування Ca^{2+} залежної NOS в ендотеліальних клітинах. Очевидно, в такому випадку локальна вазодилатація судин можливо проходить за рахунок NO, який поступив з еритроцитів крові.

Рис 1. Принципова схема прототипу

- 1 - реакційна колба,
- 2 - капельна воронка,
- 3 - реометр,
- 4 - склянки з розчином KOH,
- 5 - склянка з концентрованою сірчаною кислотою,

тою,

- 6 - пастка,
- 7, 10, 11 - посудина Дюара,
- 8 - колонка з п'ятиокисом фосфору,
- 9 - конденсатори,
- 12 - скляні фільтри

Рис 2. Принципова схема пристрою для побудови кривих спорідненості дезоксигемоглобіну і міоглобіну до дії оксиду азоту. Де

- 1 - секція для розчину аскорбінової кислоти,
- 2 - секція для кристалів NaNO_2 ,
- 3, 4, 5, 6, 7 - двоходові вакуумні крани,
- 8 - кварцева кювета,
- 9 - трьохходовий кран (з отворами а, в, с) і відводом для вакуумного насоса,
- 10 - дозатор, вузол з'єднання,
- 11 - завантажувальні отвори,
- 12 - U-подібний манометр,
- 13, 14 - перехідники,
- 15 - обмінник для деоксигенації,
- 16 - відвід для вакуумного насоса,
- 17 - мембранний вакууметр,
- 18 - відвід для U-подібного манометра

Використавши вище описані властивості NO авторами розроблений пристрій для отримання і дозованої подачі оксиду азоту і побудови кривих дисоціації оксигемоглобіну в присутності NO.

Прилад складається з чотирьох частин: NO-синтезуючого вузла, дозуючого вузла, вузла для деоксигенації і виміру оптичної густини, вузла контролю вакууму і дозованої подачі атмосферного повітря.

Вузли з'єднані між собою скляними шліфами, вакуумними шлангами з вакуумними кранами, перехідниками як гарантують герметичність вузлів. Розрідження повітря в сатураторі відбувається за допомогою фор-вакуумного насоса. Синтезуючий вузол складається з двох об'ємів (рис 2). 1 - об'єм для розчину аскорбінової кислоти і для кристалів NaNO_2 (2), які з'єднані між собою скляною трубою, яка дозволяє змішувати ці компоненти після деоксигенації системи. Кожний об'єм має завантажувальний отвір (11). Синтезуючий вузол з'єднаний з дозуючим вузлом за допомогою вакуумного крану (3), який запанений в скло. Дозуючий вузол складається з власне дозуючого об'єму (10), який можна змінювати за допомогою скляних кульок, виводу до манометра (18), U-подібного скляного манометра заповненого забарвленою дистильова-

ною водою (12), трьох двоходових вакуумних кранів (4, 5, 6), переходника (13). Система з'єднана вакуумними шлангами. Дозуючий вузол з'єднаний з вузлом для виміру через складний трьохходовий кран (9), який має відвід для вакуумного насоса. Крім цього є об'єм для обміну газами (7) і вимірювальна кварцева кювета (8). Вузол для контролю вакууму і дозованої подачі повітря складається з мембранного вакууметра (17), вакуумного крану (7) і виводу для фор-вакуумного насоса (16).

Складання приладу здійснюють наступним чином: в об'єм (1) поміщують розчин аскорбінової кислоти - 15 мл і закривають завантажувальний отвір, об'єм (2) заповнюють пізніше, збирають вузол.

(10), приєднують вакуумні крани і манометри після завантаження об'єму (7) досліджуваним розчином, за допомогою модифікованого шприца, збирають кран (9), який під'єднують до мембранного манометра (17), вакуумного крану (7) і вакуумного насоса.

Для проведення вимірів параметрів NO-зв'язуючих властивостей гемоглобіну останній отримують з попередньо відмитих еритроцитів, які гемолізує у K/Na-фосфатному буфері 33мм, pH-7,36 і поміщують в обмінник (7). Приєднують вузли до вакуумного насоса, попередньо перевіривши чи закриті усі крани. Після включення насоса, відкривають кран (7) і поступово відкривають кран (6), при чому у крані (9) отвір "а" знаходиться напроти отвору "в", і в дальнішому поступово відкривають кран (3). Ця система відкривання кранів дозволяє здійснювати деоксигенування розчину гемоглобіну і розчину аскорбінової кислоти без денатурації, а також дозволяє звільнити систему від кисню.

Деоксигенацію проводять впродовж 10 - 15хв, підтримуючи температуру розчинів 37°C, постійно перемішуючи їх. Після деоксигенації гемоглобіну яку контролюють спектрофотометрично при 560нм, закривають кран (9) так, щоб отвір "с" був направлений в сторону дозатора (10), закривають крани (6, 7, 3). Далі відкривають об'єм (2), не збовтуючи об'єм (1), витирають його фільтрувальним папером, завантажують кристали NaNO_2 зверху яких поміщують фільтрувальний папір, закривають вузол. Все це проводять для запобігання передчасного реагування NaNO_2 з розчином аскорбінової кислоти, тобто передчасного синтезу NO. Підключають вузол до вакуумного насоса, відкривають крани (7, 6, 3), проводять вакуумізацію впродовж 3хв. Обережно почергово відкривають крани (4, 5), запобігаючи різким перепадам тиску в системі U-подібного манометра, щоб спричинювало втрату рідини з манометра внаслідок відсмоктування її у вакуумні трубки. Відкачування проводять до того часу, поки не перестануть виділятися міхурці газу з рідини манометра. В дальнішому не рекомендується залишати крани (5, 4) відкритими при розібраному приладі. Після завершення процесу закривають кран (7, 3) і одночасно закривають кран (5, 6). Поміщують розчин гемоглобіну в кювету в пристосований вимірювальний відсік спектрофотометра і записують електронний спектр в області 400 - 750нм RНb. Далі змішують NaNO_2 з розчином аскорбінової кислоти при закритому крані (3). Через 1хв поступово відкривають кран (3) і вводять

певну дозу NO. Дозу NO регулюють за допомогою монометра (12). Відкривають кран (9) так, щоб отвір "а" був напроти отвору "в", тим самим запускають NO до розчину гемоглобіну, інтенсивно перемішують 10 - 12 сек і записують спектр поглинання в згаданій ділянці спектру. Цю процедуру проводять до повного насичення. Виміри проводять при 480 нм. Будують графіки залежності вмісту нітросо гемоглобіну в процентах від тиску NO поданого в сатуратор.

При дослідженні впливу оксиду азоту на кисневодисоційні криві процедуру проводять аналогічно. Лише після зв'язування потрібної дози NO, проводять додаткове відкачування залишків газу при закритих кранах (5, 4, 3), кран (9) відкритий так, щоб отвір "а" був напроти отвору "в". Запускання атмосферного повітря проводять відкриваючи кран (7) при відкритому крані (6) і закритих кранах (3, 4, 5). Дозування атмосферного повітря проводять за допомогою мембранного вакууметра (17). Покази оптичної густини вимірюють при 480 нм. Збільшуючи парціальний тиск кисню в кюветі і знімаючи покази оптичної густини (D) при даній довжині хвилі, отримують 5-6 показів, за якими будують КДО досліджуваного розчину. Будують графіки залежності процентного вмісту оксигемоглобіну від парціального тиску кисню поданого в кювету.

Роботу пристрою можна проілюструвати наступними прикладами.

Приклад 1. Отримання оксиду азоту NO in vitro.

Для генерації NO використовували властивість розчину аскорбінової кислоти відновлювати NO² до NO. Для підтвердження того, що це справді окис азоту (NO), була сконструйована система, яка складається з двох секцій з'єднаних між собою за допомогою гайок. Для генерації газу в нижній сектор поміщали концентрований розчин аскорбінової кислоти до якої додавали NaNO₂ (кристалічний)

0,5г. У верхній сектор поміщали гемоглобін в дезоксиформі, отриманий за допомогою дтіоніту (Na₂S₂O₄).

Прилад залишали на інкубування на 2 год при t = 6°C. Повітряна шапка між двома целофановими мембранами запобігає проникненню іонів NO², безпосередньо в розчин дезоксигемоглобіну, сухий дтіоніт позбавляє атмосферу повітряної шапки від надлишку кисню. Целофанові мембрани пропускають газ, який проходячи в розчин з дезоксигемоглобтом перетворює його в нітросогемоглобін.

Приклад 2. Вплив оксиду азоту NO на кисневодисоційні криві дихальних гемопротеїдів.

При дослідженні впливу оксиду азоту на кисневодисоційні криві працюють аналогічно. Після зв'язування потрібної дози NO, проводять додаткове відкачування залишків газу при закритих кранах (5, 4, 3), кран (9) відкритий так, щоб отвір "а" був напроти отвору "в". Запускання атмосферного повітря проводять відкриваючи кран (7) при відкритому крані (6) і закритих кранах (3, 4, 5). Дозування атмосферного повітря проводять за допомогою мембранного вакууметра (17). Покази оптичної густини знімають при 480 нм. Збільшуючи парціальний тиск кисню в кюветі і визначають покази оптичної густини (D) при даній довжині хвилі, отримують 5 - 6 показів, за якими будують КДО досліджуваного розчину. Будують графіки залежності процентного вмісту оксигемоглобіну від парціального тиску кисню поданого в кювету.

Розроблений авторами пристрій є неадекватним за своєю простотою вище описаному пристрою. Він є надійним і ефективним за швидкістю і чистотою отримання оксиду азоту в цій системі і не вимагає додаткових економічних затрат. У запропонованому пристрої лише один вузол-синтезуючий виконує функцію отримання оксиду азоту замість складного пристрою прототипу.

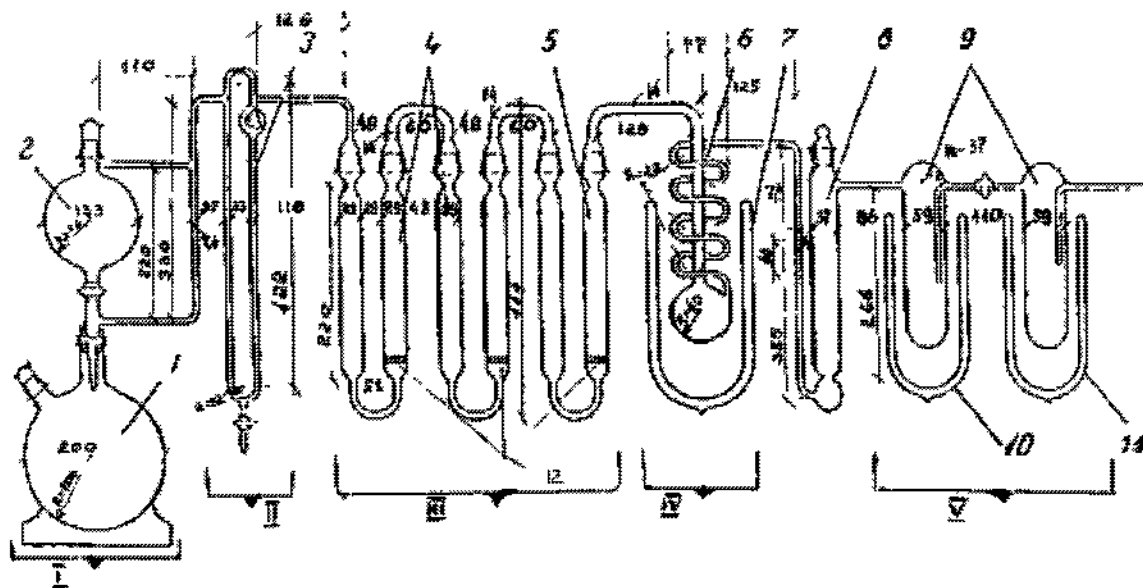


Рис. 1

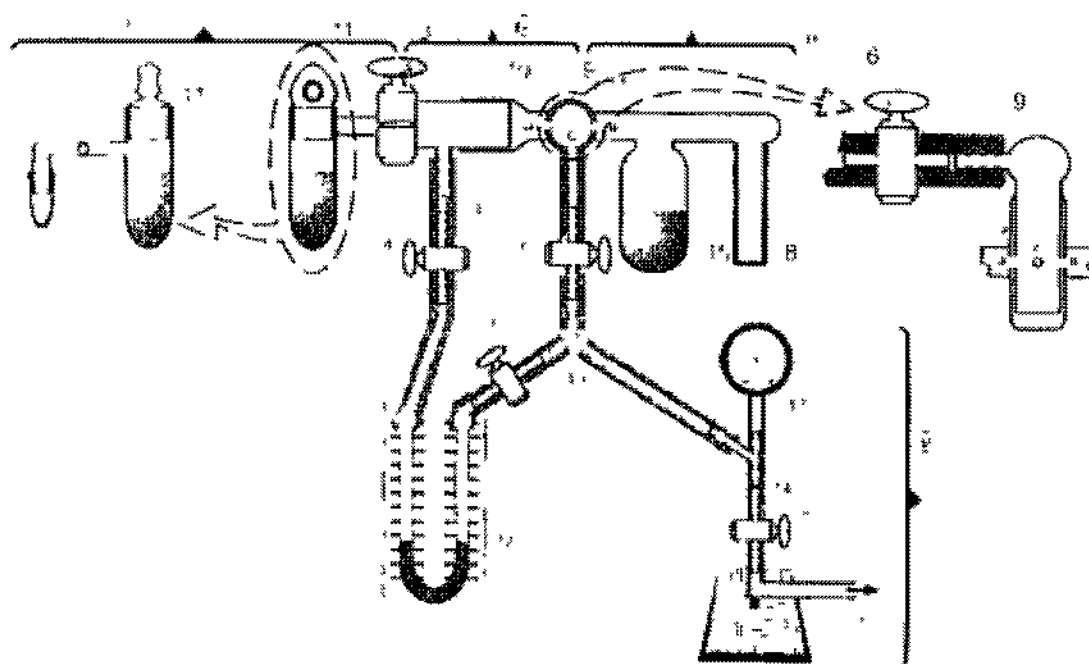


Рис. 2