

## МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ И СТАНДАРТИЗАЦИИ

УДК 612.392.61-07  
©Коллектив авторов

### МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ НИТРИТА/НИТРАТА ( $\text{NO}_x$ ) В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

*П.П.Голиков, Н.Ю.Николаева*

НИИ скорой помощи им. Н.В.Склифосовского, 129010, Москва,  
Б. Сухаревская пл., 3; факс (095) 921-02-02

Разработан метод определения  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  ( $\text{NO}_x$ ) в сыворотке крови с помощью восстановления  $\text{NO}_3^-$  гранулами кадмия до  $\text{NO}_2^-$ . Пробы сыворотки крови депротеинизировали NaOH с сульфатом цинка и восстанавливали нитрат до нитрита гранулами кадмия. В модельных опытах определены параметры полного восстановления  $\text{NO}_3^-$  гранулами кадмия в  $\text{NO}_2^-$ . Возврат  $\text{NO}_3^-$ , добавленного к пробам сыворотки крови, под влиянием кадмия составляет 96-105%. Воспроизводимость результатов (CV) в исследованиях с идентичной сывороткой крови варьирует в пределах 6,8%, ежедневная точность составляет 2,1%. Предел чувствительности метода - 0,9 мкмоль/л, а количественная чувствительность - 2,1 мкмоль/л. Калибровочный график для нитрита/нитрата ( $\text{NO}_x$ ) линейный в диапазоне концентраций от 2,1 до 200 мкмоль/л в плазме крови. Средняя концентрация  $\text{NO}_x$ , определенная в сыворотке крови 39 здоровых доноров составляет  $26,2 \pm 1,1$  мкмоль/л.

**Ключевые слова:** нитрит/нитрат,  $\text{NO}_x$ , сыворотка крови, гранулы кадмия.

**ВВЕДЕНИЕ.** Оксид азота (NO) принимает участие в регуляции сосудистого тонуса, нейроклеточной сигнализации, цитотоксичности, антимикробной защите [1]. Оксид азота ингибирует агрегацию тромбоцитов [2]. Специфическую функцию оксида азота в органах и тканях определяют изоформы синтазы оксида азота (NOS): нейрональная (nNOS, NOS1), индуцибельная (iNOS, NOS2) и эндотелиальная (eNOS, NOS3) [1]. Высокий уровень генерации оксида азота индуцибельной синтазой оксида азота вызывает токсический эффект, характеризующийся повреждением клеточных структур, мутацией ДНК, развитием апоптоза [3]. В связи с этим большой интерес вызывают методы определения оксида азота в биологических жидкостях, в сыворотке крови в особенности.

К прямым методам определения оксида азота относится метод электронного парамагнитного резонанса [4] и метод определения NO с помощью селективных NO-анализаторов [5]. К числу непрямых методов относятся методы, основанные на определении стабильных метаболитов оксида азота - нитрита и нитрата. Большинство непрямых методов определения оксида азота включает восстановление нитрата до нитрита, определение которого проводится с помощью

# МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ НИТРИТА/НИТРАТА

реакции Грисса [6]. Для восстановления нитрата до нитрита чаще всего используются кадмиевые колонки с медным покрытием [7] или нитратредуктаза [8]. Определенное научно-практическое значение имеют методы определения стабильных метаболитов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии [9] и капиллярного электрофореза [10]. В научных исследованиях для определения метаболитов оксида азота нередко применяют метод хемилюминесценции [11].

Сочетанное определение нитрита/нитрата ( $\text{NO}_x$ ) в сыворотке крови здоровых людей, по данным различных авторов [12-46], характеризуется очень большими количественными расхождениями (табл.). Таким образом, количественное содержание нитрита/нитрата в сыворотке крови здоровых людей, по данным многих авторов, независимо от методов исследования, в среднем составляет  $29,2 \pm 1,9$  мкмоль/л ( $n = 35$ ). При этом использование даже одного и того же метода определения содержания  $\text{NO}_x$  в сыворотке крови здоровых людей, по данным разных авторов, дает существенные различия. Так, при определении уровня  $\text{NO}_x$  в сыворотке крови здоровых людей с помощью реактор-восстановителя, стенки которого покрыты реагентным слоем, содержащим кадмий, обработанный медью, по данным одних авторов [7], концентрация  $\text{NO}_x$  составляет 54 мкмоль/л, по другим [47] - 10 мкмоль/л. При применении нитратредуктазы в качестве восстановителя  $\text{NO}_3^-$  до  $\text{NO}_2^-$  также отмечены значительные различия содержания  $\text{NO}_x$  в сыворотке крови здоровых людей: 39 мкмоль/л [15] и 19 мкмоль/л [31]. Наиболее высокие концентрации  $\text{NO}_x$  в сыворотке крови здоровых людей получены при использовании хромато-масс спектрометра - 72 мкмоль/л [40].

Целью данного исследования является разработка доступного сравнительно простого надежного и чувствительного метода одновременного определения нитрита/нитрата ( $\text{NO}_x$ ) в сыворотке крови с использованием гранул кадмия.

**МЕТОДИКА.** За основу разработки метода определения  $\text{NO}_x$  в сыворотке крови нами был взят принцип, согласно которому кадмий в присутствии цинка восстанавливает нитрат до нитрита [48]. В процессе разработки метода определенные сложности возникли в связи с этапом освобождения белка из сыворотки крови. Предложенные рядом авторов [48, 49] способы освобождения белка из сыворотки крови различными концентрациями сульфата цинка оказались

Таблица. Содержание нитрита/нитрата ( $\text{NO}_x$ ) в сыворотке крови здоровых людей, по данным различных авторов

№	Содержание $\text{NO}_x$ , мкмоль/л	Авторы	№	Содержание $\text{NO}_x$ , мкмоль/л	Авторы
1	12	Avontuur J. et al. [36]	19	29	Szaleczky E. et al. [26]
2	13	Ranta V. et al. [33]	20	31	Tsukada T. et al. [37]
3	15	Steege J.C. et al. [34]	21	31	Brodzski J. et al. [13]
4	16	Jaekle R.K. et al. [46]	22	31	Maeda S. et al. [20]
5	17	Wierusz B. et al. [32]	23	31	Reimund J.M. et al. [28]
6	19	Albornoz L. et al. [31]	24	34	Hoeldtke R.D. et al. [12]
7	20	Strand O.A. et al. [23]	25	34	Spack L. et al. [42]
8	21	Lopez B.L. et al. [44]	26	34	Hori T. et al. [21]
9	22	Node K. et al. [43]	27	36	Schulz R. et al. [22]
10	22	Cicinelli E. et al. [27]	28	36	Lin S.H. et al. [45]
11	23	Lovell S.L. et al. [25]	29	37	Choi I.C. et al. [19]
12	23	Node K. et al. [41]	30	37	Yu C.M. et al. [16]
13	24	Minamino T. et al. [39]	31	39	Wang Z. et al. [15]
14	25	Sanada M. et al. [18]	32	41	Cuzzolin L. et al. [24]
15	26	Gorenflo M. et al. [17]	33	41	Kakoki M. et al. [29]
16	27	Minamino T. et al. [35]	34	46	Zunic G. et al. [30]
17	29	Catalano M. et al. [38]	35	46	Tsikak D. et al. [40]
18	29	Desideri G. et al. [14]			

неприемлемыми в связи с помутнением проб несмотря на 30-минутное центрифугирование при 9000 g. Поэтому был использован ранее разработанный нами способ освобождения белка из сыворотки крови, применяемый при определении содержания нитрита в сыворотке крови [50]. С этой целью пробы сыворотки крови замораживали и хранили при  $-30^{\circ}\text{C}$  до измерения. Перед определением концентрации  $\text{NO}_x$  в образцах сыворотки крови последние оттаивали и депротеинизировали добавлением 0,8 мл 0,5 M NaOH и 0,8 мл 10 % раствора сульфата цинка к 0,4 мл сыворотки. Содержимое пробирки перемешивали (30 сек) и центрифугировали 15 минут при 9000 g. После этого содержание белка в пробах не превышало 20-50 мг/л. Надосадочную жидкость (1,5 мл) смешивали с равным объемом реактива Грисса (1% сульфаниламид, 0,1% нафтилендиамин, 2,5 % фосфорная кислота) и инкубировали 10 минут при комнатной температуре. Измерение абсорбции раствора проводили на спектрометре при длине волны 546 нм [51]. Концентрацию  $\text{NO}_x$  в сыворотке крови определяли с помощью стандарта, в качестве которого использовали нитрит натрия [50].

Восстановление нитрата до нитрита в освобожденных от белка пробах проводили с помощью гранулированного кадмия (массовая доля гранулированного кадмия  $> 99,96\%$ ). Предварительно гранулы кадмия промывали бидистиллированной водой, 0,1 M HCl и снова - бидистиллированной водой до нейтральной реакции среды. Параметры полноты восстановления гранулами кадмия, добавленного в пробы, нитрата в нитрит определяли по концентрационной зависимости нитрита, верифицированного с помощью реакции Грисса.

Исследование содержания  $\text{NO}_x$  проведено у 39 доноров, которые по клиническим, биохимическим и иммунологическим параметрам не имели отклонений от нормы.

Результаты обработаны методом вариационной статистики с применением критерия  $t$  Стьюдента.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** В модельных опытах была изучена полнота восстановления нитрата под влиянием гранул кадмия. К 0,4 мл бидистиллированной воды (вместо сыворотки) добавляли 0,8 мл 0,5 M NaOH, 0,8 мл 10 % раствора сульфата цинка и различные концентрации нитрата (0; 10; 20; 30 и 40 мкмоль/л). Содержимое пробирки перемешивали (30 сек) и центрифугировали 15 минут при 9000 g. В надосадочную жидкость вносили гранулы кадмия. После восстановления нитрата в нитрит к надосадочной жидкости (1,5 мл) добавляли равный объем реактива Грисса и инкубировали 10 минут при комнатной температуре. Измерение абсорбции раствора проводили на спектрометре при длине волны 546 нм. Из рис.1 видно, что под влиянием гранул кадмия нитрат полностью восстанавливается до нитрита, о чем свидетельствует очень тесная прямая корреляционная взаимосвязь ( $r = 0,987$ ;  $p < 0,001$ ) между нитратом и нитритом. Возврат добавленного нитрата составил 98-103%. Аналогичные результаты получены в опытах, в которых вместо 0,4 мл воды в пробирки вносили 0,4 мл сыворотки. В этом случае коэффициент корреляции между добавленными концентрациями нитрата и определяемыми концентрациями нитрита составил 0,971 ( $p < 0,01$ ). Возврат добавленного нитрата составил 96-105%.

Изучение воспроизводимости результатов проведено с идентичной сывороткой. Результаты исследований показали, что коэффициент вариации (CV) составил 6,8% ( $n = 13$ ), при этом ежедневная точность соответствовала 2,1% ( $n = 12$ ). Предел чувствительности метода достигает 0,9 мкмоль/л, а количественная чувствительность - 2,1 мкмоль/л  $\text{NO}_x$ . Калибровочный график для  $\text{NO}_x$  был линейным в диапазоне концентраций от 2,1 до 200 мкмоль/л в плазме крови (рис. 2).

Оценка метода проведена путем определения концентрации нитрита/нитрата ( $\text{NO}_x$ ) в сыворотке крови 39 здоровых доноров. Результаты исследований показали, что средняя концентрация  $\pm$  ошибка средней  $\text{NO}_x$  в сыворотке крови доноров составляет  $26,2 \pm 1,1$  мкмоль/л.

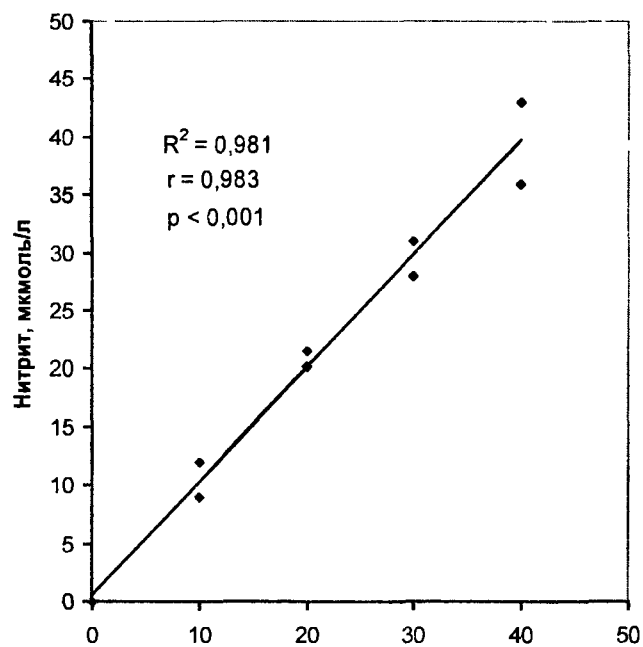


Рисунок 1.

Восстановление нитрата гранулами кадмия до нитрита.

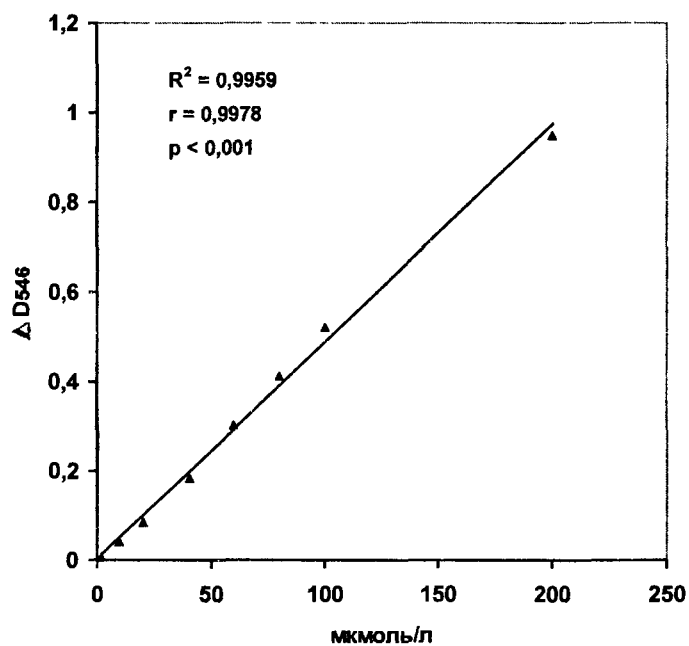


Рисунок 2.

Калибровочный график для нитрита/нитрата (NOx). По оси ординат - оптическая плотность при 546 нм. По оси абсцисс - концентрация нитрита.

В настоящее время широкое применение для восстановления нитрата до нитрита получили выпускаемые различными фирмами реакторы, стенки которого покрыты реагентным слоем, содержащим кадмий, обработанный медью [7, 47, 52, 53]. При этом определяемые с их помощью уровни нитрита/нитрата в сыворотке крови добровольцев имеют значительные различия - от 54 [7] до 19 [53], 10 [47]

мкмоль/л. Эти различия, по-видимому, связаны не столько с методическими различиями, сколько с популяционными особенностями исследуемых контингентов. Так, установлено, что у волонтеров с эндотелиальной синтазой оксида азота 4aa концентрация нитрита/нитрата была 28 мкмоль/л, а у волонтеров с эндотелиальной синтазой оксида азота 4bb - 35 мкмоль/л [37]. С этими данными, в известной мере, согласуются результаты исследований, согласно которым при инфаркте миокарда выявлены группы больных с низким и высоким уровнем продукции нитрита/нитрата [47].

Предложенный нами метод определения концентрации  $\text{NO}_x$  в сыворотке крови здоровых доноров характеризуется высокой воспроизводимостью, количественной чувствительностью, линейностью большого диапазона концентраций  $\text{NO}_2$  - для калибровочной кривой и новыми возможностями изучения роли системы оксида азота в патогенезе заболеваний.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Johnson M.L., Billiar T.R. (1998) World J. Surg. **22**, 187-196.
2. Северина И.С. (1998) Биохимия. **63**, 939-947.
3. Radi R., Beckman J.S. Bush K.M., Freeman B.A. (1991) Arch. Biochem. Biophys., **288**, 481-487
4. Ванин А.Ф., Блюменфельд Л.А., Четвериков А.Г. (1967) Биофизика, **12**, 829-843
5. Stolarek R., Kulf P., Kurmanowska Z, Nowak D. (1998) Int. Clin. Lab. Res., **28**, 104-109
6. Green L.C., Wagner D.A., Glogowski J., Skipper P.L., Wishnork J.S., Tannenbaum S.R. (1982) Anal. Biochem., **126**, 131-138.
7. Charmandari E., Meadows N., Patel M., Johnston A., Benjamin N. (2001) J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr., **32**, 423-427.
8. Borcherdig H., Leikefeld S., Frey C., Diekmann S., Steinrucke P. (2000) Anal. Biochem., **282**, 1-9.
9. Komori K., Matsumoto T., Ishida M., Kuma S., Yonemitsu Y., Eguchi D., Sugimachi K. J. (1997) Vasc. Surg. **26**, 657-662.
10. Ueda T., Maekawa T., Sadamitsu D., Oshita S., Ogino K., Nakamura K. (1995) Electrophoresis., **16**, 1002-1004.
11. Akiyama K., Kimura A., Suzuki H., Takeyama Y., Gluckman T.L., Terhakopian A., Katagiri T., Suh K.Y., Roseto J., Bing R.J. (1998) J. Am. Coll. Cardiol., **32**, 373-379
12. Hoeldtke R.D., Bryner K.D., McNeill D.R., Hobbs G.R., Riggs J.E., Warehime S.S., Christie I., Ganser G., Van Dyke K. (2002) Diabetes., **51**, 2817-2825
13. Brodzski J., Lanne T., Stale H., Batra S., Marsal K. (2002) BJOG. **109**, 546-552.
14. Desideri G., Marinucci M.C., Tomassoni G., Masci P.G., Santucci A., Ferri C. (2002) J. Clin. Endocrinol. Metab., **87**, 2940-2945.
15. Wang Z., Zhu Y. (2001) Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi., **36**, 209-211.
16. Yu C.M., Fung P.C., Chan G., Lai K.W., Wang Q., Lau C.P. (2001) Am. J. Cardiol., **88**, 867-870.
17. Gorenflo M., Zheng C., Poge A., Bettendorf M., Werle E., Fiehn W., Ulmer H.E. (2001) Clin. Lab., **47**, 441-447.
18. Sanada M., Higashi Y., Nakagawa K., Sasaki S., Kodama I., Sakashita T., Tsuda M., Ohama K. (2001) Atherosclerosis., **158**, 391-397.
19. Choi I.C., Fung P.C., Leung A.Y., Lie A.K., Liang R. (2001) Haematologica., **86**, 972-976.

20. Maeda S., Miyauchi T., Kakiyama T., Sugawara J., Iemitsu M., Irukayama-Tomobe Y., Murakami H., Kumagai Y., Kuno S., Matsuda M. (2001) *Life Sci.*, **69**, 1005-1016.
21. Hori T., Matsubara T., Ishibashi T., Higuchi K., Ochiai S., Takemoto M., Imai S. (2001) *J. Cardiol.*, **38**, 21-28.
22. Schulz R., Schmidt D., Blum A., Lopes-Ribeiro X., Lucke C., Mayer K., Olschewski H., Seeger W., Grimminger F. (2000) *Thorax.*, **55**, 1046-1051.
23. Strand O.A., Leone A., Giercksky K.E., Kirkeboen K.A. (2000) *Crit. Care Med.*, **28**, 2779-2785.
24. Cuzzolin L., Lussignoli S., Crivellente F., Adami A., Schena F., Bellavite P., Brocco G., Benoni G. (2000) *Int. J. Sports Med.*, **21**, 289-293.
25. Lovell S.L., Stevenson H., Young I.S., McDowell G., McEneaney D., Riley M.S., Nicholls D.P. (2000) *Eur. J. Clin. Invest.*, **30**, 181-187.
26. Szaleccky E., Pronai L., Nakazawa H., Tulassay Z. (2000) *J. Clin. Gastroenterol.*, **30**, 47-51.
27. Cicinelli E., Ignarro L.J., Schonauer L.M., Matteo M.G., Galantino P., Falco N. (1999) *Clin. Physiol.*, **19**, 440-442.
28. Reimund J.M., Duclos B., Koehl C., Lehr L., Ezenfis J., Baumann R. (1999) *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, **11**, 1013-1018.
29. Kakoki M., Matsumoto A., Nagata D., Kobayakawa N., Kimura K., Momomura S., Hirata Y. (1999) *Clin. Nephrol.*, **52**, 83-90.
30. Zunic G., Spasic S., Jelic-Ivanovic Z. (1999) *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.*, **30**, 73-79.
31. Albornoz L., Alvarez D., Otaso J.C., Gadano A., Salviu J., Gerona S., Sorroche P., Villamil A., Mastai R. (1999) *J. Hepatol.*, **30**, 451-455.
32. Wierusz B., Zozulinska D., Kempa M., Skowronski M., Murawska A. (1998) *Pol. Arch. Med. Wewn.*, **100**, 139-144.
33. Ranta V., Viinikka L., Halmesmaki E., Ylikorkala O. (1999) *Obstet. Gynecol.*, **93**, 442-445.
34. Steege J.C., Koster-Kamphuis L., van Straaten E.A., Forget P.P., Buurman W.A. (1998) *Free Radic. Biol. Med.*, **25**, 953-963.
35. Minamino T., Kitakaze M., Sanada S., Asanuma H., Kurotobi T., Koretsune Y., Fukunami M., Kuzuya T., Hoki N., Hori M. (1998) *Circulation.*, **98**, 1721-1727.
36. Avontuur J.A., Boomsma F., van den Meiracker A.H., de Jong F.H., Bruining H.A. (1999) *Circulation.*, **99**, 271-275.
37. Tsukada T., Yokoyama K., Arai T., Takemoto F., Hara S., Yamada A., Kawaguchi Y., Hosoya T., Igari J. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **245**, 190-193.
38. Catalano M., Carzaniga G., Perilli E., Jun T., Scandale G., Andreoni S., Carotta M. (1997) *Vasc. Med.*, **2**, 302-305.
39. Minamino T., Kitakaze M., Sato H., Asanuma H., Funaya H., Koretsune Y., Hori M. (1997) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **17**, 3191-3195.
40. Tsikas D., Boger R.H., Bode-Boger S.M., Gutzki F.M., Frolich J.C. *J. Chromatogr. B.* (1994) *Biomed. Appl.*, **18**, 185-191.
41. Node K., Kitakaze M., Yoshikawa H., Kosaka H., Hori M. (1997) *Hypertension.*, **30**, 405-408.
42. Spack L., Havens P.L., Griffith O.W. (1997) *Crit Care Med.*, **25**, 1071-1078.
43. Node K., Kitakaze M., Yoshikawa H., Kosaka H., Hori M. (1997) *Am. J. Cardiol.*, **79**, 1538-1541.
44. Lopez B.L., Barnett J., Ballas S.K., Christopher T.A., Davis-Moon L., Ma X. (1996) *Acad. Emerg. Med.*, **3**, 1098-1103.

45. Lin S.H., Chu P., Yu F.C., Diang L.K., Lin Y.F. (1996) ASAIO J. **42**, 895-899.
46. Jaekle R.K., Lutz P.D., Rosenn B., Siddiqi T.A., Myatt L. (1994) Am. J. Obstet. Gynecol., **171**, 1115-1119.
47. Дранкина О.М., Задорожная О.О., Ивашкин В.Т., Манухина Е.Б., Малышев И.Ю. (2000) Клин. мед. № 3, 19-23.
48. Grand F., Guitton J., Goudable J. (2001) Ann. Biol. Clin. (Paris). **59**, 559-565.
49. Minnard E.A., Shou J., Naama H. (1994) Arch. Surg., **129**, 142-148.
50. Голиков П.П., Николаева Н.Ю., Гавриленко И.А. (2000) Пат. физиол., №2, 6-9.
51. Tanigawa K. (1999) J. Critica Care., **14**, 186-190.
52. Лямина Н.П., Сенчихин В.Н., Покидышев Д.А., Манухина Е.Б. (2001) Кардиология. № 9, 17-21.
53. Коробейникова Э.Н., Кудревич Ю.В. (2001) Клинич. лабор. диагностика. № 10, 2-3.

Поступила 10.12.2002

# METHOD OF THE MEASUREMENT OF NITRITE/NITRATE (NO<sub>x</sub>) IN SERUM

*P.P. Golikov, N.Yu.Nikolayeva*

Sklifosovsky Clinical and Research Institute for Emergency Medicine,  
3 B. Sukharevskaya Square, 129010 Moscow, RUSSIA. Fax: +7(095) 921-02-02

Nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) and nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) concentrations are usually measured as a marker of NO metabolism. The aim of this study was to validate and standardize the method for the quantification of these two metabolites (nitrite and nitrate) in serum. The samples (serum) were deproteinized with NaOH, zinc sulfate and reduced with cadmium granules. Analytical recovery of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> added to serum samples after reduction with cadmium granules was 96-105% (Griess reaction). Calibration curves for nitrate and nitrite were linear over the concentration range of 2.1 to 200 micromol/L in plasma. The detection limit of the assay was 0.9 micromol/L and the quantitation limit was 2.1 micromol/l. Usual values were determined from healthy subjects: the mean concentration of NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (NO<sub>x</sub>) was 26.2±1,1 micromol/l (mean±SEM) (n = 39). Within-run precision was 6,8% and between-day precision was 2.1%.

**Key words:** nitrite/nitrate, NO<sub>x</sub>, serum, cadmium granules