

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 612.126:546.172.6-311.083

Жлоба А.А.^{1,2}, Субботина Т.Ф.^{1,2}, Алексеевская Е.С.^{1,2}

СОДЕРЖАНИЕ ОКИСЛОВ АЗОТА В ПЛАЗМЕ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ЛИЦ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВОЗРАСТА

¹ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава РФ, 197022, Санкт-Петербург;

²ФГБУ «Северо-Западный Федеральный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава РФ, 197341, Санкт-Петербург, Российская Федерация

*Работа посвящена исследованию суммарной концентрации нитритов и нитратов (NOx) в плазме крови здоровых лиц, проживающих в Санкт-Петербурге. Исследованы образцы 58 здоровых лиц, из них 31 — в возрасте от 18 до 25 лет и 27 — в возрасте от 48 до 63 лет. Концентрацию NOx в плазме крови определяли с помощью реактива Грисса после восстановления нитратов под действием НАДН-зависимой рекомбинантной нитратредуктазы из *Arabidopsis thaliana*. Избыток НАДН, мешающий реакции Грисса, удаляли окислением за счет ферментативной реакции в присутствии лактатдегидрогеназы и избытка пирувата натрия. Анализ и его калибровку проводили методом добавок раствора нитрата натрия к образцам плазмы крови без депротеинизации. Получены данные о варьировании содержания NOx у здоровых лиц различного возраста. В частности, показано, что уровень суммарного содержания окислов азота в группе старшего возраста был достоверно выше ($p = 0,0001$), чем у доноров в возрасте от 18 до 25 лет.*

Ключевые слова: нитриты; нитраты; NOx; реакция Грисса; нитратредуктаза; плазма крови.

Для цитирования: Жлоба А.А., Субботина Т.Ф., Алексеевская Е.С. Содержание окислов азота в плазме крови здоровых лиц в зависимости от возраста. Клиническая лабораторная диагностика. 2016; 61 (11): 760-765. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-11-760-765

Zhloba A.A.^{1,2}, Subbotina T.F.^{1,2}, Alekseevskaya E.S.^{1,2}

THE CONTENT OF NITRIC OXIDE IN BLOOD PLASMA OF HEALTH PERSONS DEPENDING ON AGE

¹The I.P. Pavlov first St.Petersburg state medical university, 197022 St.Petersburg, Russia

²The V.A. Almazov North-Western Federal medical research center of Minzdrav of Russia, 197341 St. Petersburg, Russia

*The article considers results of study of total concentration of nitrites and nitrates (NOx) in blood plasma of healthy individuals residing in St. Petersburg. The samples from 58 healthy individuals were analyzed and out of them - 31 aged 18-25 years and 27 aged 48-63 years. The concentration of NOx in blood plasma was determined using Griess reagent after reduction of nitrates under effect of NADH-dependent recombinant nitrate reductase from *Arabidopsis thaliana*. The surplus of NADH preventing Griess reaction was removed at the expense of enzyme reaction in presence of lactate dehydrogenase and sodium pyruvate. The analysis and its calibration was carried out using additions of solution of sodium nitrate to samples of blood plasma without deproteinization. The data was obtained concerning variation of content of NOx in healthy individuals of various age. In particular, it is demonstrated that the level of total content of nitrogen oxide in the group of elder age was reliably higher ($p=0.0001$) as compared with donors aged 18-25 years.*

Key words:

For citation: Zhloba A.A., Subbotina T.F., Alekseevskaya E.S. The content of nitric oxide in blood plasma of health persons depending on age. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2016; 61 (11): 760-765 (in Russ.). DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-11-760-765

For correspondence: Zhloba A.A., doctor of medical sciences, professor, head of department of biochemistry. e-mail: zhloba@mail.spbnit.ru

Information about authors:

Zhloba A.A., <http://orcid.org/0000-0003-0605-761>

Subbotina T.F., <http://orcid.org/0000-0002-2278-8391>

Alekseevskaya E.S., <https://orcid.org/0000-0003-4200-1848>

Acknowledgments. The authors would like to express their gratitude for organizational and information support to the Blood transfusion Department of Pavlov First Saint Petersburg State Medical University and its Head B.A. Baryshev.

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Financing. The study had no sponsor support.

Received 18.02.2016
Accepted 15.03.2016

Для корреспонденции: Жлоба Александр Анатольевич, д-р мед. наук, проф., рук. отдела биохимии НИЦ ПСПбГМУ им. И.П. Павлова; рук. группы протеомики СЗФМИЦ им. В.А. Алмазова; e-mail: zhloba@mail.spbnit.ru

Введение. Монооксид азота (NO) — важная сигнальная молекула как внутри клетки, так и на уровне межклеточного взаимодействия. NO, образуясь из Arg под действием ферментов NO-синтаз (NOS), среди которых выделяют нейрональную (nNOS, или NOS1), индуцибельную (iNOS, или

NOS2) и эндотелиальную (eNOS, или NOS3) изоформы, выступает в качестве нейротрансмиттера, играет роль в процессах воспаления и вазодилатации. Будучи крайне реакционно-активной молекулой с временем существования *in vivo* в несколько долей секунды [1], оксид азота сохраняется в плазме крови в виде нитрозотиолов (Цис-34 нитрозоальбумин [2]), которые могут детектироваться при помощи флуоресцентных зондов [3]. Нитриты и нитраты в отличие от нитрозотиолов представляют собой стабильные конечные продукты окисления NO, по уровню которых в крови можно судить об интенсивности образования NO в организме [4]. Поскольку iNOS обладает способностью быстро экспрессироваться и активироваться, определение высших оксидов азота (NOx) чаще используется при различных острых воспалительных процессах, включая сепсис [5, 6], и реже — при оценке функции эндотелия [7]. NOx все шире применяются в диагностике также благодаря выпуску современных тест-систем для анализа [8], среди которых наиболее распространены наборы с использованием ферментативного восстановления нитратов с последующим определением нитритов [9].

В литературе описано несколько методических подходов к определению NOx [10, 11], включая использование селективных электродов [12] и спектрофотометрические методики с применением реактива Грисса [13]. Этот метод наиболее распространен. Поскольку основным высшим оксидом азота в биологических жидкостях служат нитраты, а в реакции Грисса вступают нитриты, при определении NOx этим методом необходим этап восстановления нитратов в нитриты. Существует энзиматический способ восстановления нитратов с использованием нитратредуктазы [7, 14–16], а также химическое восстановление с применением металлов (кадмий, ванадий) [17–20]. Оба подхода имеют методические особенности и ограничения [21–23], которые необходимо учитывать для получения корректных результатов. Настоящая работа предпринята ввиду большой разницы в значениях уровней NOx в зависимости от региона и возраста обследованных по данным различных исследований. Работа также направлена на уточнение важнейших методических особенностей определения NOx в плазме крови с использованием нитратредуктазной реакции для восстановления нитратов.

Цель работы — определение значений NOx в группе здоровых лиц, проживающих в Санкт-Петербурге, и выработка рекомендаций по калибровке анализа с применением реакции Грисса после нитратредуктазной стадии восстановления нитратов в образцах плазмы крови.

Материал и методы. Материал исследования — плазма крови, взятая из кубитальной вены утром натощак в вакутейнеры с ЭДТА в качестве антикоагулянта. Процедуру отделения форменных элементов крови проводили путем центрифугирования в течение 15 мин при 580 g (3000 об/мин). Образцы плазмы до анализа хранили при температуре –80 °С.

Исследованы образцы 58 здоровых добровольцев: 1) 31 человек (6 мужчин и 25 женщин) в возрасте от 18 до 25 лет; 2) 27 регулярных доноров крови (14 мужчин и 13 женщин) в возрасте от 48 до 63 лет. Критериями включения в исследование стали удовлетворительное самочувствие, отсутствие хронических заболеваний и острых воспалительных процессов по результатам анкетирования. У всех молодых здоровых лиц артериальное давление на момент забора крови составляло 120/80 мм рт. ст., температура тела — 36,6 °С, индекс массы тела (ИМТ) находился в пределах от 19 до 25. Среди регулярных доноров крови артериальное давление варьировало от 110/70 до 140/90 мм рт. ст., ИМТ — от 20 до 30. Во всех случаях имелось информированное согласие на анонимное использование полученных в результате исследования данных.

Уровень высших оксидов азота определяли с использова-

нием реактива Грисса в модификации, изложенной далее. В качестве восстановителя нитратов применяли рекомбинантную НАДН-нитратредуктазу растительного происхождения из *Arabidopsis thaliana* (Sigma-Aldrich, США). Лиофилизованный фермент растворяли в 50 ммоль/л фосфатном буфере pH 6,86 до получения раствора с активностью 1 U/мл. Плазме в количестве 80 мкл и 20 мкл воды приливали к 100 мкл фосфатного буфера pH 6,86, содержащего 1 ммоль/л ЭДТА и 450 мкмоль/л НАДН. Для получения калибровочного графика использовали метод добавок: несколько образцов плазмы анализировали в дубле с добавлением в один из образцов вместо воды 20 мкл раствора нитрата натрия с известной концентрацией (от 10 до 750 мкмоль/л). С учетом соотношения объемов плазмы и добавки калибровочного раствора график строился в диапазоне от 2 до 150 мкмоль/л. Полученную смесь объемом 200 мкл инкубировали с 5 мкл препарата фермента в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем избыток НАДН, тормозящий реакцию Грисса, удаляли путем окисления при добавлении фермент-субстратной смеси лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и пирувата натрия (ПВК) в объеме 20 мкл. Через 5 мин вносили в образцы 200 мкл 1% реактива Грисса на 30% уксусной кислоте. После добавления реактива Грисса интенсивность окраски измеряли при 546 нм. В качестве холостой пробы использовали образец, в который вместо плазмы вносили 80 мкл воды. Для исключения влияния светорассеяния и поглощения за счет плазмы крови в тех же условиях инкубировали пробы с внесением объемов воды вместо ферментных препаратов (нитратредуктаза и смесь ЛДГ-ПВК) в присутствии 30% уксусной кислоты вместо реактива Грисса. Из оптической плотности каждого образца вычитали значение поглощения холостой пробы и соответствующей пробы с уксусной кислотой.

Статистическую обработку результатов выполняли с использованием пакета программ SAS 9.3. Степень соответствия закона распределения данных нормальному распределению оценивали с помощью критериев Шапиро—Вилко и Колмогорова—Смирнова. Значения концентрации NOx у здоровых лиц представлены в виде перцентилей. Для оценки межгрупповых различий использован непараметрический критерий Манна—Уитни. Корреляционный анализ проведен с применением критерия Спирмена. Критический уровень достоверности нулевой статистической гипотезы принимали равным 0,05.

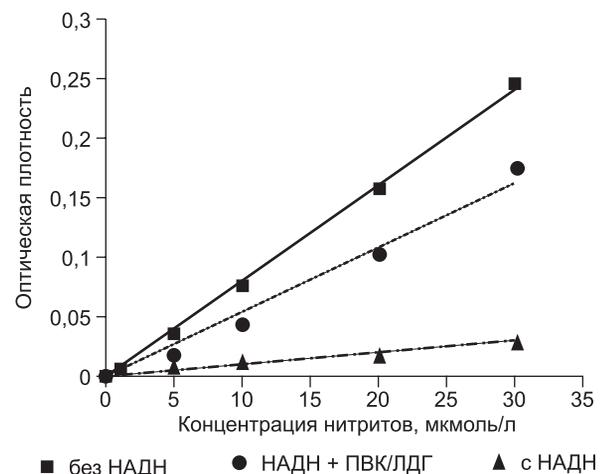


Рис. 1. Влияние НАДН (конечная концентрация 75 мкмоль/л) на развитие окраски в реакции Грисса в водной среде без плазмы крови.

ЛДГ — лактатдегидрогеназа; ПВК — пирувиноградная кислота.

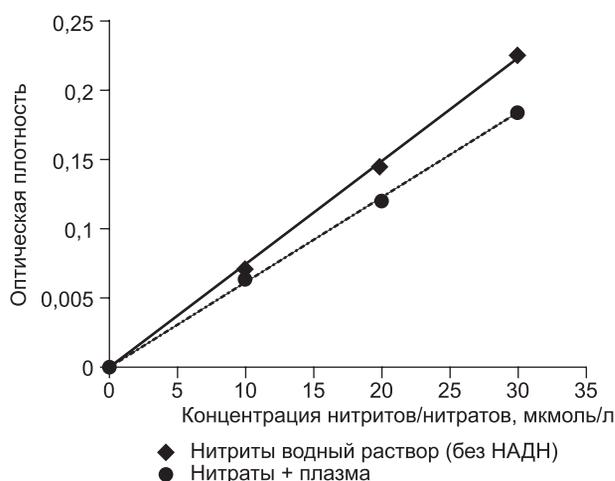


Рис. 2. Восстанавливаемость нитратов в среде с плазмой крови.

Результаты. Использование фермент-субстратной смеси ЛДГ-ПВК позволило преодолеть понижающее влияние НАДН на развитие окраски в ходе реакции Грисса (рис. 1). При добавлении в реакцию смесь плазмы крови в количестве 80 мкл (19% в пересчете на конечный объем с реактивом Грисса) показатели оптической плотности при восстановлении нитратов были наиболее близки к таковым для нитритов в среде без НАДН (рис. 2). Поэтому калибровочные графики для расчета концентрации NOx в образцах следует строить с использованием метода добавок путем внесения растворов солей нитратов в образцы плазмы. В случае построения калибровочных графиков на водных растворах значения концентрации NOx в биоматериале могут быть существенно завышены.

В табл. 1 приведены данные о воспроизводимости использованной методики. Концентрация нитрита натрия, дающая оптическую плотность 0,005, составила 0,64 мкмоль/л. Линейность калибровочного графика, построенного методом добавок нитрата натрия к плазме, оценена в диапазоне до 150 мкмоль/л.

Для концентрации NOx в плазме крови здоровых лиц обнаружено повышение с возрастом ($p = 0,0001$, критерий Манна—Уитни; рис. 3). Распределение значений концентрации NOx в каждой из возрастных групп и у всех здоровых лиц в целом подчинялось логнормальному закону распределения ($p > 0,5$ для логнормального распределения, критерий Колмогорова—Смирнова). Исходя из этого, описательная статистика значений концентрации NOx представлена в виде перцентилей, однако для удобства сравнения полученных результатов с данными других исследователей среднее значение и стандартное отклонение также приведены (табл. 2). Коэффициент биологической вариации уровня NOx в обеих возрастных группах здоровых лиц оказался сопоставим — 42 и 49% для группы 1 и 2 соответственно.

Различий уровней NOx, связанных с полом, у обследованных лиц не обнаружено. Также в ходе корреляционного анализа внутри каждой из возрастных групп не обнаружено связи с возрастом, ИМТ и уровнем артериального давления.

Обсуждение. Угнетающее влияние восстановленных форм никотинамидных коферментов на реакцию образования азокрасителей известно давно [24]. Тем не менее в некоторых современных работах этап удаления избытка НАД(Ф)Н в описании методик определения NOx с использованием реактива Грисса отсутствует [7]. Поскольку влияние окислен-

Таблица 1

Воспроизводимость результатов определения NOx при использовании предлагаемой методики

Конечная концентрация добавки нитратов, мкмоль/л	Число повторов	Внутрисерийная воспроизводимость (сходимость)		Межсерийная воспроизводимость	
		Средняя концентрация, мкмоль/л	Коэффициент аналитической вариации, CV, %	Средняя концентрация, мкмоль/л	Коэффициент аналитической вариации, CV, %
10	5	10,7	5,7	10,8	7,5
50	5	50,0	4,0	49,0	6,2
100	5	104,7	2,2	101,2	4,8

ных форм этих коферментов на реакцию Грисса минимально [25], наиболее целесообразным способом удаления избытка НАД(Ф)Н становится его окисление, хотя также описан подход с использованием небольшого количества восстановленного кофермента, предусматривающий его регенерацию по мере расходования для восстановления нитрат-ионов [26]. Хотя для ферментативного окисления НАД(Ф)Н используют разные ферменты [14, 27], применение ЛДГ наиболее распространено в силу того, что равновесие ферментативной реакции сильно смещено в сторону образования лактата и окисления кофермента соответственно.

Добавление смеси ЛДГ-ПВК для удаления избытка НАДН, как это приведено в настоящей работе, позволило существенно снизить его отрицательное влияние на реакцию Грисса. Удаление белка из образцов плазмы крови часто используют для пробоподготовки перед проведением реакции Грисса [28, 29]. Влияние биоматериала на образование азокрасителя в ходе реакции Грисса зависит от его количества и может быть скорректировано путем уменьшения объема исследуемого образца [23]. Объемная доля плазмы крови после добавления реактива Грисса в предлагаемой нами модификации методики определения NOx составила 19%. Механизмы влияния белков и низкомолекулярных компонентов на реакцию Грисса остаются неизученными. Влияние же их на реакцию ферментативного восстановления нитратов может зависеть от связывания и побочного процесса окисления восстановленных коферментов. В настоящей работе показано, что восстановление нитратов протекает достаточно эффективно в присутствии белков плазмы в условиях рекомендуемой нами реакционной смеси (см. методы исследования). Согласно полученным результатам, некоторое влияние со стороны матрицы (см. рис. 2) наблюдается, поэтому калибровку анализа целесообразно проводить с использованием раствором нитрата, проводя восстановления не в водных растворах, а методом добавок к анализируемым образцам плазмы крови.

Диапазон значений NOx у здоровых лиц от 18 до 25 лет составил 4,6—19,9 мкмоль/л и 9,3—36,8 мкмоль/л для возраста 48—63 года, что согласуется с результатами прямого детектирования NOx методом ВЭЖХ для старшей возрастной группы в восточноевропейской популяции [30]. Данные литературы о значениях NOx у здоровых лиц при восстановлении в нитратредуктазной реакции и другими методами разнятся. В табл. 3 представлены результаты определения NOx с использованием нитратредуктазной реакции для восстановления нитратов различных авторов. Большой разброс данных наблюдается при использовании коммерческих наборов реактивов — от значений менее 1 мкмоль/л [16] до десятков и сотен мкмоль/л [15], что указывает на трудности не только в ходе пробоподготовки, но и на аналитическом

Таблица 2

Значения концентрации NOx (мкмоль/л) у здоровых лиц разных возрастных групп

Возрастные группы	M ± SD	Перцентили				
		50-й (медиана)	5-й	25-й	75-й	95-й
18—25 лет						
Всего (n = 31)	11,1 ± 4,7	10,6	4,6	7,5	13,9	19,9
Мужчины (n = 6)	11,1 ± 4,6	9,5	6,7	7,8	14,4	18,7
Женщины (n = 25)	11,1 ± 4,8	10,6	4,6	7,5	12,8	19,9
48—63 года						
Всего (n = 27)	19,5 ± 9,6	16,4	9,3	11,4	23,4	36,8
Мужчины (n = 14)	18,7 ± 7,1	17,9	10,8	12,2	22,4	31,7
Женщины (n = 13)	20,3 ± 12,1	15,9	9,0	11,2	23,4	48,7

этапе исследований. Одни из наиболее высоких значений концентрации NOx получены в случае отсутствия коррекции фоновой экстинкции плазмы крови, не подвергавшейся депротеинизации [7]. Процедура удаления белков в ходе пробоподготовки, например осаждение или ультрафильтрация, имеет целью также улучшить оптические свойства анализируемого материала. Тем не менее результаты уровней NOx у здоровых лиц существенно отличаются в разных исследованиях даже при условии удаления белков из анализируемых образцов. Использование депротеинизации может влиять на конечный результат определения NOx, возможно, тем, что при удалении белков высвобождаются лиганды, влияющие на реакцию Грисса. Отмечено, что загрязнение устройств для ультрафильтрации нитратами и нитритами может быть причиной завышения результатов анализа, а при использовании для осаждения белков кислот или солей цинка, напротив, может произойти потеря нитритов из образца [22]. Ricart-Jané D. и соавт. показали нецелесообразность ультрафильтрации при определении NOx в ЭДТА-плазме, так как данная процедура приводила к завышению результатов определения NOx в ЭДТА-, но не гепаринизированной плазмы [33]. Исследуя влияние различных антикоагулянтов на определение NOx с использованием реактива Грисса, эти авторы пришли к вы-

воду, что наиболее удачным образом для анализа является ЭДТА-плазма без ультрафильтрации [33]. В большинстве работ по определению NOx с использованием нитратредуктазы и реактива Грисса калибровочные графики строятся на водных растворах (см. табл. 3). Как белки, так и низкомолекулярные соединения, которые не удаляются из образца при депротеинизации, влияют на результат анализа [22]. Как показали результаты настоящего исследования, в присутствии плазмы крови в реакционной смеси условия для восстановления нитратов и развития реакции Грисса остаются приемлемыми, а результат — воспроизводимым при параллельном учете как фонового светопоглощения материала, так и полноты восстановления нитратов. Таким образом, возможно, разброс значений NOx, по данным различных исследований, частично обусловлен отсутствием оценки влияния биоматериала на ход анализа. Исходя из наших данных, эта оценка должна проводиться не только на этапе отработки методики, но постоянно, как минимум в ходе каждой аналитической серии. При использовании в качестве референсной аналитической процедуры метода прямой регистрации окислов азота за счет их собственного светопоглощения после хроматографического разделения получены данные, близкие к приведенным нами в табл. 2 [30]. Наиболее близкие результаты с использованием реакции Грисса после нитратредуктазного восстановления нитратов получены в работе [32], где анализ был также проведен с использованием методики построения калибровочного графика методом добавок к биоматериалу [27].

В случае использования для восстановления металлов с переменной валентностью (ванадий, кадмий) референсные значения NOx также значительно варьируют в различных исследованиях, несмотря на проведение депротеинизации и учет мутности образца [17, 18, 20, 34]. Так, для здоровых лиц старше 30 лет в одном исследовании уровень NOx составил порядка 12 ± 3 мкмоль/л [34], а в другом варьировал в диапазоне 52,8 ± 28,8 мкмоль/л в условиях соблюдения обследованными лицами диеты с пониженным содержанием нитратов [20]. Вероятно, на восстановительные свойства металлов, зависящие также от площади реакционной поверхности, которую трудно оценить и стандартизовать, могут существенно влиять компоненты матрицы.

Относительно гендерных различий и ассоциированных с возрастом изменений концентрации NOx в литературе также встречаются противоречивые данные. В исследовании M. Torrakçi и соавт. [35] обнаружено постепенное снижение концентрации нитратов с возрастом вне зависимости от пола — от 12,8—95,2 мкмоль/л для возрастной группы 6—15 лет до 0,8—42 мкмоль/л у лиц 45—60 лет. Эти авторы определяли нитраты без применения реактива Грисса по падению оптической плотности при 340 нм в ходе расходования НАДФН в нитратредуктазной реакции. Во многих работах различий между мужчинами и женщинами, а также изменений относительно возраста не выявлено или не указано об обнаружении таковых [7, 14, 15, 20, 34]. В работах A. Ghasemi и соавт. на достаточно больших выборках обнаружены как гендерные различия, так и изменение концентрации NOx с возрастом. Более высокие значения NOx у лиц мужского пола обнаружены в возрастных группах 4—19 лет [36] и 20—29 лет [19]; для лиц старше 30 лет гендерные различия нивелировались [19]. В возрасте 50—59 лет обнаружено повышение концентрации NOx относительно более молодых лиц как у мужчин, так и у женщин [19]. В более поздней работе по исследованию концентрации NOx у взрослых лиц указано на увеличение с возрастом верхней границы референсного интервала для данного показателя, а также на разнонаправленное изменение этой границы у мужчин и женщин при увеличении ИМТ [37].

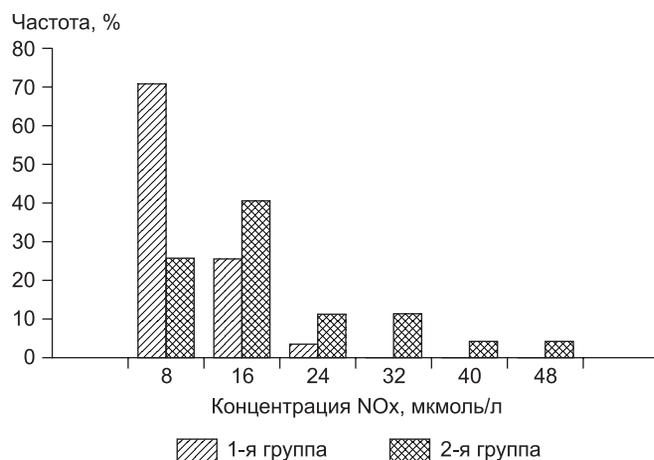


Рис. 3. Распределение значений концентрации NOx у здоровых лиц.

1-я группа — от 18 до 25 лет; 2 группа — от 48 до 63 лет.

Вариация значений NOx, определенных с помощью нитратредуктазного метода восстановления нитратов и реактива Грисса у здоровых лиц, по данным литературы

Сумма нитратов и нитритов $M \pm SD$, мкмоль/л	Характеристика группы	Материал	Учет фонового светопоглощения за счет биоматериала	Удаление избытка НАД(Ф)Н	Способ построения калибровочного графика	Примечание	Ссылка
41,6 ± 27,8	n = 210 50 ± 12 лет 110/100 ²	Плазма	Нет	Нет	С использованием раствора нитрита. Без учета влияния матрицы	Использована НАДФН-зависимая нитратредуктаза	Ramesh S.S. и соавт., 2014 [7]
0,85 ± 1,05	n = 20 23—65 лет 11/9	Сыворотка, пробоподготовка не указана	Не указано	Да	С использованием раствора нитрата. Без учета влияния матрицы	Использован коммерческий набор, НАДФН-зависимая нитратредуктаза	Purnak T. и соавт., 2012 [16]
8,3 ± 4,0	n = 28 48 ± 11 лет 10/18	Сыворотка, пробоподготовка не указана	Не указано	Да	С использованием раствора нитрата. Без учета влияния матрицы	Использован коммерческий набор, НАДФН-зависимая нитратредуктаза	Uysal S. и соавт., 2011 [31]
18,7 ± 4,8	n = 82 50—75 лет 41/41	Плазма после ультрафильтрации	Не указано	Да	Метод добавок раствора нитрита к биоматериалу.	Использована НАДФН-зависимая нитратредуктаза	Brinkley T.E. и соавт., 2009 [32]
73,8 (39,4—120,9) ¹	n = 128 45—60 лет 70/58	Плазма после ультрафильтрации	Не указано	Не указано	С использованием раствора нитрата. Без учета влияния матрицы	Использован коммерческий набор, НАДФН-зависимая нитратредуктаза	Yoon Y. и соавт., 2000 [15]
32,8 ± 12,33 81,0 ± 34,04	n = 24 25—54 года 12/12	Сыворотка ³ и плазма ⁴ после ультрафильтрации	Нет	Да	С учетом полноты восстановления нитратов в ультрафильтрате сыворотки. Значительные различия в показателях для плазмы и сыворотки.	Использована НАДФН-зависимая нитратредуктаза	Giovanconi G. и соавт., 1997 [14]

Примечание: ¹ Данные представлены в виде медианы и 25—75-го перцентилей; ² Здесь и далее указано количество мужчин и женщин.

Помимо методических особенностей при оценке результатов определения концентрации NOx следует учитывать возможность влияния диеты и состояния микрофлоры кишечника. По данным Н.Г. Гумановой и соавт., у здоровых лиц без контроля потребления нитратов с пищей значения NOx были существенно выше, чем в подгруппе соблюдавших диету с пониженным содержанием нитратов [20]. По данным других исследователей, особенности диеты не влияют на уровень нитратов и нитритов в крови, и даже в случае введения больших доз нитратов уровень NOx нормализуется в течение суток [38]. С учетом этих результатов при сохранной функции почек для корректной оценки концентрации нитратов и нитритов в крови достаточно соблюдать условие забора крови утром натощак. Результаты исследования полиморфизма eNOS в различных популяциях [39] указывают на возможность вариации референсных значений NOx в зависимости от региона и целесообразность их определения для каждой популяции в отдельности.

Выводы. 1. Удаление белка из образцов плазмы крови не является обязательной процедурой при пробоподготовке.

2. Калибровочный график для расчета концентрации NOx рекомендуется строить путем добавок известных концентраций как нитратов, так и нитритов к анализируемым пробам с целью учета влияния биоматериала на полноту восстановления нитратов и хода цветной реакции.

3. Содержание NOx в плазме крови молодых доноров в возрасте от 18 до 25 лет по крайней мере на 50% ниже, чем в образцах лиц в возрасте 48 лет — 63 года.

Благодарности. Авторы выражают благодарность сотрудникам отделения переливания крови ПСПбГМУ им. И.П. Павлова и его руководителю Б.А. Барышеву за организационную и информационную поддержку в ходе проведения настоящего исследования.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках выполнения государственного задания по темам: «Инновационные подходы к изучению актуальных проблем патологии органов дыхания (пневмонии, хронические обструктивные болезни легких, интерстициальные и орфанные заболевания легких): эпидемиология, доклиническая диагностика, механизмы патогенеза, генетические иммунные, метаболические дефекты защиты», «Аналитические технологии, методы подготовки материала и алгоритмы обработки данных при поиске устойчивых сдвигов объектов метаболома, пептидома и протеома биопроб крови и тканей человека для диагностики и прогнозирования течения социально-значимых заболеваний».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1—2, 4—17, 19—39 см. REFERENCES)

- Жлоба А.А., Субботина Т.Ф., Александрова Л.А., Безушко А.О., Карцова А.А. Контроль исследования уровня оксида азота. *Лаборатория*. 2013; (1): 29.

18. Метельская В.А., Гуманова Н.Г. Скрининг-метод определения уровня метаболитов оксида азота в сыворотке крови. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2005; (6): 15—8.

REFERENCES

1. Kelm M., Schrader J. Control of coronary vascular tone by nitric oxide. *Circ. Res.* 1990; 66(6): 1561—75.
2. Trescher K., Dzilic E., Kreibich M., Gasser H., Aumayr K., Kerjaschki D. et al. The nitric oxide donor, S-nitroso human serum albumin, as an adjunct to HTK-N cardioplegia improves protection during cardioplegic arrest after myocardial infarction in rats. *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.* 2015; 20(3): 387—94.
3. Zhloba A.A., Subbotina T.F., Aleksandrova L.A., Bezushko A.O., Kartsova A.A. Control of nitric oxide determination. *Laboratoriya*. 2013; (1): 29. (in Russian)
4. Tsikas D. Methods of quantitative analysis of the nitric oxide metabolites nitrite and nitrate in human biological fluids. *Free Radic. Res.* 2005; 39(8): 797—815.
5. Mitaka C., Hirata Y., Yokoyama K., Wakimoto H., Hirokawa M., Nosaka T. et al. Relationships of circulating nitrite/nitrate levels to severity and multiple organ dysfunction syndrome in systemic inflammatory response syndrome. *Shock*. 2003; 19(4): 305—9.
6. Kothari N., Bogra J., Kohli M., Malik A., Kothari D., Srivastava S. et al. Role of active nitrogen molecules in progression of septic shock. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 2012; 56(3): 307—15.
7. Ramesh S.S., Prasanthi A., Bhat D.I., Devi B.I., Cristopher R., Philip M. Correlation between plasma total nitric oxide levels and cerebral vasospasm and clinical outcome in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage in Indian population. *J. Neurosci. Rural. Pract.* 2014; 5(Suppl. 1): S22-7.
8. Total Nitric Oxide and Nitrate/Nitrite Parameter Assay Kit. Available at: https://www.mdsystems.com/products/total-nitric-oxide-and-nitrate-nitrite-parameter-assay-kit_kge001.
9. Sun J., Zhang X., Broderick M., Fein H. Measurement of nitric oxide production in biological systems by using Griess reaction assay. *Sensors*. 2003; 3(8): 276—84.
10. Wu A., Duan T., Tang D., Xu Y., Feng L., Zheng Z. et al. Determination of nitric oxide-derived nitrite and nitrate in biological samples by HPLC coupled to nitrite oxidation. *Chromatographia*. 2013; 76: 1649—55.
11. Carmann C., Lilienthal E., Weigt-Usinger K., Schmidt-Choudhury A., Hörster I., Kayacelebi A.A. et al. The L-arginine/NO pathway, homocysteine, and nitrite-dependent renal carbonic anhydrase activity in young people with type 1 diabetes mellitus. *Amino Acids*. 2015; 47(9): 1865—74.
12. Boo Y.C., Tressell S.L., Jo H. An improved method to measure nitrate/nitrite with an NO-selective electrochemical sensor. *Nitric Oxide*. 2007; 16(2): 306—12.
13. Matsunaga K., Nishimura M. Determination of nitrate in sea water. *Analytica Chimica Acta*. 1969; 45(2): 350—3.
14. Giovannoni G., Land J.M., Keir G., Thompson E.J., Heales S.J. Adaptation of the nitrate reductase and Griess reaction methods for the measurement of serum nitrate plus nitrite levels. *Ann. Clin. Biochem.* 1997; 34(Pt.2): 193—8.
15. Yoon Y., Song J., Hong S.H., Kim J.Q. Plasma nitric oxide concentrations and nitric oxide synthase gene polymorphisms in coronary artery disease. *Clin. Chem.* 2000; 46(10): 1626—30.
16. Purnak T., Beyazit Y., Ibis M., Koklu S., Efe C., Ozaslan E. et al. The involvement of nitric oxide in the physiopathology of hepatoportal sclerosis. *Clin. Biochem.* 2012; 45(16-17): 1450—4.
17. Miranda K.M., Espy M.G., Wink D.A. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide*. 2001; 5(1): 62—71.
18. Metel'skaya V.A., Gumanova N.G. Screening as a method for determining the serum level of nitric oxide metabolites. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2005; (6): 15—8. (in Russian)
19. Ghasemi A., Zahedi Asl. S., Mehrabi Y., Saadat N., Azizi F. Serum nitric oxide metabolite levels in a general healthy population: relation to sex and age. *Life Sci.* 2008; 83(9-10): 326—31.
20. Gumanova N.G., Teplova N.V., Ryabchenko A.U., Denisov E.N. Serum nitrate and nitrite levels in patients with hypertension and ischemic stroke depend on diet: a multicenter study. *Clin. Biochem.* 2015; 48(1-2): 29—32.
21. Beda N., Nedospasov A. A spectrophotometric assay for nitrate in an excess of nitrite. *Nitric Oxide*. 2005; 13(2): 93—7.
22. Tsikas D. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: Appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2007; 851(1-2): 51—70.
23. Giustarini D., Rossi R., Milzani A., Dalle-Donne I. Nitrite and nitrate measurement by Griess reagent in human plasma: evaluation of interferences and standardization. *Methods Enzymol.* 2008; 440: 361—80.
24. Medina A., Nicholas D.J. Interference by reduced pyridine nucleotides in the diazotization of nitrite. *Biochim. Biophys. Acta.* 1957; 23(2): 440—2.
25. Moody A.J., Shaw F.L. Reevaluation of the Griess reaction: how much of a problem is interference by nicotinamide nucleotides? *Anal. Biochem.* 2006; 356(1): 154—6.
26. Verdon C.P., Burton B.A., Prior R.L. Sample pretreatment with nitrate reductase and glucose-6-phosphate dehydrogenase quantitatively reduces nitrate while avoiding interference by NADP+ when the Griess reaction is used to assay for nitrite. *Anal. Biochem.* 1995; 224(2): 502—8.
27. Fryburg D.A. NG-monomethyl-L-arginine inhibits the blood flow but not the insulin-like response of forearm muscle to IGF-I: possible role of nitric oxide in muscle protein synthesis. *J. Clin. Invest.* 1996; 97: 1319—28.
28. Moshage H., Kok B., Huizenga J.R., Jansen P.L. Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. *Clin. Chem.* 1995; 41(6Pt.1): 892—6.
29. Romitelli F., Santini S.A., Chierici E., Pitocco D., Tavazzi B., Amorini A.M. et al. Comparison of nitrite/nitrate concentration in human plasma and serum samples measured by the enzymatic batch Griess assay, ion-pairing HPLC and ion-trap GC-MS: the importance of a correct removal of proteins in the Griess assay. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2007; 851(1-2): 257—67.
30. Alusik S., Jedlickova V., Paluch Z., Zecova S. Plasma levels of nitrite/nitrate and inflammation markers in elderly individuals. *Bratisl. Lek. Listy.* 2008; 109(7): 289—92.
31. Uysal S., Armutcu F., Aydogan T., Akin K., Iking M., Yigitoglu M.R. Some inflammatory cytokine levels, iron metabolism and oxidant stress markers in subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *Clin. Biochem.* 2011; 44(17-18): 1375—9.
32. Brinkley T.E., Fenty-Stewart N.M., Park J.Y., Brown M.D., Hagberg J.M. Plasma nitrate/nitrite levels are unchanged after long-term aerobic exercise training in older adults. *Nitric Oxide*. 2009; 21(3-4): 234—8.
33. Ricart-Jané D., Llobera M., López-Tejero M.D. Anticoagulants and other preanalytical factors interfere in plasma nitrate/nitrite quantification by the Griess method. *Nitric Oxide*. 2002; 6(2): 178—85.
34. Ratajczak-Wrona W., Jablonska E., Antonowicz B., Dziemianczyk D., Grabowska S.Z. Levels of biological markers of nitric oxide in serum of patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Int. J. Oral. Sci.* 2013; 5(3): 141—5.
35. Toprakçi M., Ozmen D., Mutaf I., Turgan N., Parildar Z., Habif S. et al. Age-associated changes in nitric oxide metabolites nitrite and nitrate. *Int. J. Clin. Lab. Res.* 2000; 30(2): 83—5.
36. Ghasemi A., Zahediasl S., Azizi F. Reference values for serum nitric oxide metabolites in pediatrics. *Nitric Oxide*. 2010; 23(4): 264—8.
37. Ghasemi A., Zahediasl S., Azizi F. Reference values for serum nitric oxide metabolites in an adult population. *Clin. Biochem.* 2010; 43(1-2): 89—94.
38. Miller G.D., Marsh A.P., Dove R.W., Beavers D., Presley T., Helms C. et al. Plasma nitrate and nitrite are increased by a high-nitrate supplement but not by high-nitrate foods in older adults. *Nutr. Res.* 2012; 32(3): 160—8.
39. Dellamea B.S., Pinto L.C., Leitão C.B., Santos K.G., Canani L.H. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and risk of diabetic nephropathy: a systematic review and meta-analysis. *BMC Med. Genet.* 2014; 15: 9.