مجلة غدد درون‌ريز و متابوليسم ايران
دانشگاه علوم پزشكي و خدمات بهداشتي ـ درماني شهيد بهشتي
دورة هفتم، ضميمة شمارة ۴، صفحه‌هاي ۴۳۹ ـ ۴۳۳ (زمستان ۱۳۸۴)

مقالة پژوهشي

# ارزيابي روشي ساده و سريع براي اندازه‌گيري اكسيد نيتريك سرمي در ميكروپليت

اصغر قاسمي[۱،۲]، دكتر مهدي هدايتي[۱]، دكتر علي‌خوش‌باطن[۲]

## چكيده

**مقدمه: علاقة فزاينده به بررسي اثرات نيتريك اكسايد بيانگر اهميت نياز به يك روش ساده براي اندازه‌گيري غلظت اين ماده است. به دليل كوتاه بودن نيمه عمر، اندازه‌گيري مستقيم نيتريك اكسايد نسبتاً مشكل است، لذا با استفاده از متابوليت‌هاي پايدار آن يعني نيتريت و نيترات اندازه‌گيري آن انجام پذير است و اين سنجش يك تخمين قابل اطمينان از برون ده نيتريك اكسايد در محيط *in vivo* فراهم مي‌آورد. اگرچه اندازه‌گيري اين آنيون‌ها به روش گريس از مدت‌ها قبل انجام مي‌شود، با توجه به نياز به حجم بالاي اندازه‌گيري نيتريك اكسايد در طرح‌هاي پژوهشي مختلف، هدف از اين مطالعه راه‌اندازي، بهينه سازي و بررسي اعتبار اندازه‌گيري ميزان نيتريت + نيترات (NOx) سرم طبق واكنش گريس در ميكروپليت با روشي ساده و ارزان است. مواد و روش‌ها: براي انجام اين‌كار نيترات موجود در نمونه‌ها با استفاده از كلريد وانادیوم به نيتريت تبديل شد. سپس از دي آزوتاسيون سولفوناميد به كمك نيتريت در محيط اسيدي و كنژوگاسيون آن با يک آمين دو حلقه‌اي مادة رنگي تشكيل و جذب نوري آن در ۵۴۰ نانومتر خوانده شد و با استفاده از منحني استاندارد غلظت نمونه‌هاي مجهول محاسبه شد. يافته‌ها: نتايج نشان داد كه منحني استاندارد رسم شده تا غلظت ۱۵۰ ميكرومولار خطي و حساسيت روش ۲ ميكرومولار بود. ضريب تغييرات درون و برون آزمون كمتر از ۶ درصد و بازيافت ۹۳-۹۱ درصد نشان دهنده دقت و صحت قابل قبول روش است. نتيجه‌گيري: استفاده از روش ارايه شده براي اندازه‌گيري متابوليت‌هاي نيتريك اكسايد با استفاده از واكنش گريس در ميكروپليت از دقت و صحت قابل قبولي برخوردار است.**

واژگان كليدي: نيتريك اكسايد، واكنش گريس، كالريمتري، ميكروپليت، حساسيت، دقت، صحت

دريافت مقاله:۸۴/۱۱/۱۵ ـ دريافت اصلاحيه: ۸۴/۱۲/۱ ـ پذيرش مقاله: ۸۴/۱۲/۱

## مقدمه

اولين بار در سال ۱۹۸۰ يك عامل گشاد كنندة رگي مشتق از آندوتليوم توسط فرچگات و زاواتزكي، گزارش شد و چند سال پس از آن، مشخص شد كه عامل مذكور نيتريك اكسايد است.[۱] نيتريك اكسايد علاوه بر نقش گشادكنندگي در سلول‌هاي عضلة صاف عروق در انواعي از فرآيندهاي بيولوژيك نظير انتقال عصبي،[۱،۲،۳] پروليفراسيون عضلة صاف عروقي،[۴] تجمع پلاكتي،[۵] فرآيند توليد مثل و حاملگي،[۶] آپوپتوز،[۷] و عملكرد طبيعي كليه[۸] نقش دارد. اخيرا افزايش يا كاهش نيتريك اكسايد با بسياري از حالات پاتولوژيك مرتبط دانسته شده است، كه اين امر از يك نقش هومئوستاتيك براي

۱) مركز تحقيقات غدد درون‌ريز و متابوليسم شهيد بهشتي؛ دانشگاه علوم پزشكي و خدمات بهداشتي ـ درماني شهيد بهشتي ۲) گروه فيزيولوژي و بيوفيزيك، مركز تحقيقات آسيب‌هاي شيمايي، دانشگاه علوم پزشكي بقيه‌الله (عج)، **نشاني مكاتبة نويسندة مسؤول:** تهران، صندوق پستي ۴۷۶۳-۱۹۳۹۵؛
E-mail: as_qasemi@yahoo.com :اصغر قاسمي

اين مولكول حكايت دارد.[۹] نيتريك اكسايد در برخي از فرآيندهاي پاتولوژيك مانند التهاب،[۳،۸] شوك سپتيك،[۳،۹] آسم و همچنين پرفشاري خون، فراموشي (دمانس)،[۹] سرطان، سكته و ديابت[۱۰] نقش دارد. علاقة فزاينده به بررسي اثرات نيتريك اكسايد بيانگر اهميت نياز به يك روش ساده براي اندازه‌گيري غلظت اين تركيب است. به دليل كوتاه بودن نيمه عمر، اندازه‌گيري مستقيم نيتريك اكسايد نسبتاً مشكل است،[۵،۱۰] از اين رو، اندازه‌گيري آن با استفاده از متابوليت‌هاي پايدارش يعني نيتريت و نيترات انجام‌پذير است و اين سنجش يك تخمين قابل اطمينان از برون‌ده نيتريك اكسايد در محيط *in vivo* فراهم مي‌آورد.[۱۰] همبستگي بالايي بين توليد نيتريك اكسايد آندوژن و سطوح نيتريت/ نيترات (NOx ) در سرم، پلاسما و ادرار گزارش شده است.[۱۱] ساده‌ترين و رايج‌ترين روش اندازه‌گيري اين آنيون‌ها روش كالريمتري به كمك واكنش گريس (Griess) است. اساس اين واكنش تشكيل يك كروموفور از دي آزوتاسيون[i] يك سولفوناميد به كمك نيتريت در محيط اسيدي و سپس كنژوگاسيون آن با يك آمين دو حلقه‌اي مثل NEDD (N-۱ نفتيل اتيلن دي‌آمين) است. دلايلي مانند ساده بودن روش، عدم نياز به ابزار گران قيمت، امكان اتوماسيون آن توسط آناليزورهاي خودكار، قابليت استفاده از نمونه‌هاي محيط كشت، سرمي، ادراري و مايع مغزي نخاعي سبب كاربرد گستردة اين روش شده است.[۱۰] هدف از اين مطالعه راه‌اندازي و بهينه نمودن شرايط اندازه‌گيري ميزان NOx سرم طبق واكنش گريس است.

## مواد و روش‌ها

### مواد

سولفوناميد، NEDD، اسيد فسفريك و اتانل از شركت مرك (آلمان) و سرم آلبومين گاوي و كلريدواناديم از شركت فلوكا (سويس)، خريداري شد. پليت اليزا از شركت نانك (دانمارك) و كيت سنجش پروتئين تام از شركت پارس آزمون ( ايران) تهيه گرديد.

### جمع آوري نمونه

براي تهية نمونه‌هاي سرمي مورد نياز در اين مطالعه، خون‌هاي گرفته شده از نمونه‌هاي انساني، به صورت اتفاقي از افراد داوطلب، جهت تشكيل لخته به مدت ۱۵ دقيقه در دماي اتاق نگهداري شد و سپس براي جداسازي سرم از لخته، به مدت ۱۵ دقيقه در ۱۰۰۰g سانتريفوژ شد. نمونه‌ها تا زمان اندازه‌گيري در دماي ۸۰- درجه سانتيگراد نگهداري شدند.

### پروتئين زدايي نمونه‌ها

مرحلة پروتئين‌زدايي براي نمونه‌هاي سرمي و پلاسمايي در واكنش گريس ضروري است.[۱۲] براي اندازه‌گيري NOx از روش‌هاي مختلفي جهت پروتئين‌زدايي سرم استفاده شده است. استفاده از سانتريفيوژ با فيلترهاي ۳۰ كيلودالتوني[۱۰] و ۱۰ كيلودالتوني،[۱۳] اتانل،[۱۰،۱۴] تركيب متانل و دي اتيل‌اتر[۱۰،۱۲] و سولفات روي[۳،۱۲] از روش‌هاي رايج براي اين منظور است. در اين مطالعه براي پروتئين‌زدايي نمونه‌هاي سرمي از رسوب‌دهي با اتانل استفاده شد. به اين منظور به ازاي ۱۰۰ ميكروليتر سرم ۲۰۰ ميكروليتر اتانل سرد اضافه (نسبت حجمي ۱ به ۲ براي نمونه به اتانل)[۱۴] و نمونه‌ها در طول شب در دماي ۴ درجه سانتيگراد نگهداري شدند. در اين مرحله براي جداسازي رسوب پروتئيني، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقيقه در ۱۰۰۰ g سانتريفيوژ شدند و ۱۰۰ ميكروليتر از فاز بالايي براي اندازه‌گيري NOx نگهداري شد.

### اندازه‌گيري پروتئين نمونه‌ها

پروتئين نمونه‌هاي سرم قبل از پروتئين‌زدايي با استفاده از كيت سنجش پروتئين تام (شركت پارس آزمون، ايران) به روش بيوره اندازه‌گيري شد. جهت سنجش ميزان پروتئين باقي مانده بعد از انجام مرحلة پروتئين‌زدايي از روش برادفورد استفاده شد.[۱۵]

### محلول‌هاي لازم براي سنجش NOx

براي تهية محلول كلرايد واناديوم (III)، ۸ ميلي‌گرم از اين تركيب در يك ميلي‌ليتر اسيد كلريدريك ۱ مولار حل شد. اين محلول در ظرف تيره حداكثر دو هفته در يخچال (۴ درجة سانتي‌گراد) قابل نگهداري است.[۱۰]

محلول سولفاناميد ۲% (وزني/ حجمي)، از انحلال ۰/۱ گرم از اين تركيب در ۵ ميلي‌ليتر اسيد كلريدريك ۵ درصد (حجمي/ حجمي) تهيه شد.[۱۰]

i- Diazotization

### محلول NEDD

محلول ۰/۱ درصد (وزني/ حجمي) NEDD با حل كردن ۰/۰۰۵ گرم از تركيب مذكور در ۵ ميلي‌ليتر آب مقطر تهيه شد،[۱۰] سولفانااميد و NEDD در دماي ۴ درجة سانتيگراد به مدت ۲ ماه قابليت نگهداري دارند.[۱۰،۱۶]

### احياي نيترات به نيتريت

در واكنش گريس، جهت تشكيل رنگ ديازو، نيتريت مورد استفاده قرار مي‌گيرد، در حالي كه سرم و پلاسما اغلب حاوي نيترات هستند؛[۱۰،۱۷] از اين رو، براي سنجش NOx ابتدا بايد نيترات به نيتريت احيا شود.[۱۰] احياي نيترات به نيتريت توسط روش‌هايي مانند استفاده از فلزات احيا كننده مثل كادميوم،[۱۰،۱۲] روش آنزيمي توسط نيترات ردوكتاز باكتريايي،[۱۰،۱۲] يا با استفاده از كلريد وانادیوم (III) انجام مي‌شود.[۱۰،۱۲] احياي نيترات توسط كادميوم زمان‌بر بوده مستلزم كار با فلزات سمي است. عيب روش آنزيماتيك نيز تداخل NADPH/NADP+ سرمي با واكنش گريس است. كلريد وانادیوم (III) در مقايسه با كادميوم سميت كمتري دارد.[۱۰] اما ناپايداري محلول آن، استفاده از آن را در كيت‌ها محدود كرده است.[۱۲] در اين مطالعه براي احياي نيترات به نيتريت از روش احياي كلريد وانادیوم (III) استفاده شد. براي اين منظور به ۱۰۰ ميكروليتر از سرم پروتئين زدايي شده، ۱۰۰ ميكروليتر كلريد وانادیوم (III) اضافه شد.

### روش اندازه‌گيري NOx

براي اندازه‌گيري غلظت نيتريت و نيترات (NOx) تام، در يك ميكروپليت الايزا ابتدا ۱۰۰ ميكروليتر سرم پروتئين‌زدايي شده سپس ۱۰۰ ميكروليتر محلول كلريد وانادیوم III اضافه شد تا نيترات‌ها به نيتريت تبديل شوند. سپس ۵۰ ميكروليتر سولفونااميد و متعاقب آن ۵۰ ميكروليتر NEDD افزوده و به مدت ۳۰ دقيقه در ۳۷ درجة سانتيگراد انكوبه شد. بعد از انجام واكنش و تشكيل رنگ، جذب نوري حاصل از تشكيل مادة رنگي در ۵۴۰ نانومتر توسط دستگاه خوانشگر الايزا (Sunrise, Tecan, Austria) قرائت و با استفاده از منحني استاندارد غلظت نمونه‌ها محاسبه شد.

با توجه به اينكه محدودة غلظت طبيعي NOx در حدود ۴۰-۳۰ ميكرومولار است[۵،۱۶،۱۸،۱۹] محدودة منحني استاندارد از صفر تا ۱۵۰ ميكرومول در ليتر در نظر گرفته شد. براي رسم منحني استاندارد ۱۰۰ ميكروليتر از غلظت‌هاي ۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۲۵و ۱۵۰ ميكرومولار نيتريت حل شده در آب مقطر كه به صورت سريال رقيق شده بودند به داخل ميكروپليت الايزا منتقل و سپس ۱۰۰ ميكروليتر محلول وانادیوم كلراید III به آن افزوده و در مرحلة بعد ۵۰ ميكروليتر محلول سولفونااميد و ۵۰ ميكروليتر محلول NEDD به آن اضافه شد و همانند نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقيقه در ۳۷ درجة سانتيگراد انكوبه شد. جذب استانداردها در ۵۴۰ نانومتر خوانده و منحني استاندارد ترسيم شد.

گذاشتن بلانك براي همة نمونه‌ها در واكنش گريس ضروري است،[۳] بلانك با جايگزيني محلول‌هاي رقيق‌كننده (اسيد كلريدريك ۵ درصد و آب مقطر) با محلول‌هاي گريس انجام شد ( سولفونااميد و NEDD).[۱۰]

### محاسبة حساسيت روش

به منظور تعيين حساسيت روش، ابتدا ميانگين و انحراف استاندارد مربوط به سيگنال استاندارد صفر در ۱۰ مرتبه تكرار محاسبه شد و براساس غلظت مرتبط با ميانگين سيگنال استاندارد صفر به علاوة دو برابر انحراف استاندارد، از منحني استاندارد، غلظت مربوط به حساسيت روش محاسبه شد. براي تأييد اين موضوع، شيب منحني استاندارد محاسبه و با حساسيت محاسبه شده مقايسه شد. در پايان نيز با تهية رقت‌هاي متوالي تا حساسيت مذكور، عملكرد نقطة حساسيت تأييد شد. محاسبه غلظت بر اساس شيب منحني استاندارد نيز در بخش نتايج آورده شده است.

### محاسبة دقت روش

به منظور بررسي دقت سنجش از دو آزمون درون سنجش[i] و برون‌سنجش[ii] در سه محدوده غلظتي پايين، متوسط و بالا با تعداد دفعات تكرار ۱۰ استفاده و ميانگين، انحراف استاندارد و درصد ضريب تغييرات محاسبه شد.

### محاسبة صحت روش

از آنجايي كه استاندارد مطلقي براي نيتريت/ نيترات جهت سنجش غير مستقيم نيتريک اكسيد در دسترس نيست، از آزمون‌هاي بررسي صحت نسبي يعني آزمون‌هاي بازيافت و توازي (پاراللیزم) استفاده شد. لازم به ذكر است آزمون بازيافت به هر دو شيوة افزايش نمونه‌ها به استاندارد و افزايش استانداردها به نمونه انجام پذيرفته است.

i- Intra-assay
ii- Inter-assay

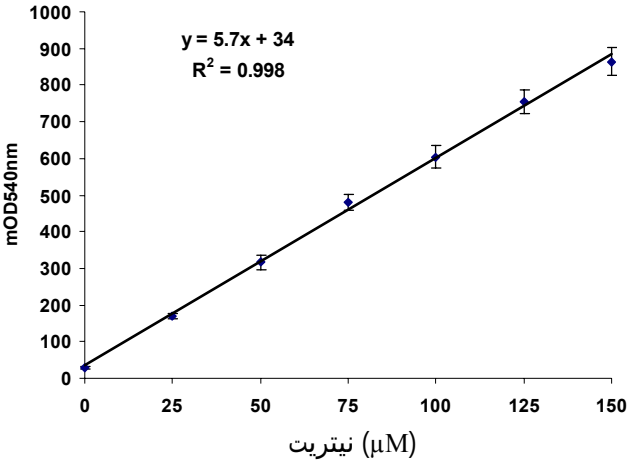
**جدول ۱- اثر استفاده از اتانل (اتانل به نمونه: ۲ به ۱ حجمي /حجمي ) بر حذف پروتئين از سرم (پروتئين سرم بر حسب ميلي‌گرم در دسي ليتر بيان شده است)**

| نمونه | پروتئين سرم قبل از دپروتئينه کردن | پروتئين سرم بعد از دپروتئينه کردن | درصد پروتئين برداشته شده |
|---|---|---|---|
| ۱ | ۴/۳ | ۰/۳ | ۹۳ |
| ۲ | ۳/۹ | ۰/۲۱ | ۹۴ |
| ۳ | ۴/۵ | ۰/۳۲ | ۹۳ |
| ۴ | ۴/۶ | ۰/۳۴ | ۹۲ |
| ۵ | ۴/۸ | ۰/۳۴ | ۹۳ |
| ۶ | ۵/۰ | ۰/۲۲ | ۹۵ |
| ميانگين | ۴/۵ | ۰/۲۸ | ۹۳ |
| انحراف معيار | ۰/۳ | ۰/۰۶ | ۱ |
| خطاي معيار | ۰/۱ | ۰/۰۲ | ۰/۴۲ |

## نتايج

### *منحني استاندارد*

نتايج حاصل از رسم منحني استاندارد در انجام ۱۰ بار آزمايش در نمودار ۱ نشان داده شده است.




**نمودار ۱- منحني استاندارد جذب نوري غلظت‌هاي مختلف نيتريت (هر نقطه ميانگين ± انحراف استاندارد ده بار آزمايش است).**

### *پروتئين زدايي*

نتايج حاصل از پروتئين‌زدايي نمونه‌ها با روش رسوب توسط اتانل (اتانل به نمونه: ۲ به ۱ حجمي / حجمي) درجدول ۱ نشان داده شده است.

### *حساسيت سنجش*

حساسيت سنجش بر اساس افزايش سيگنال از دو برابر انحراف استاندارد سيگنال غلظت صفر، ۱ ميكرومول در ليتر محاسبه شد، اما بر اساس شيب منحني استاندارد حساسيت روش ۲ ميكرومول در ليتر به دست آمد. بنابراين درمجموع حساسيت روش ۲ ميكرومول در ليتر در نظر گرفته شد.

### *دقت روش*

ضريب تغييرات درون آزمون در غلظت‌هاي ۲۵، ۷۵ و ۱۲۵ ميكرومولار به ترتيب ۵/۵، ۳/۳ و ۳/۸ درصد و ضريب تغييرات برون آزموني در همان غلظت‌ها به ترتيب ۵/۸، ۴/۵ و ۴/۶ است.

جدول ۲- نتايج آزمون درون سنجش

| غلظت | دفعات تكرار | ميانگين | انحراف استاندارد | درصد ضريب |
|---|---|---|---|---|
| ۲۵ | ۱۰ | ۲۴ | ۱/۳ | ۵/۵ |
| ۷۵ | ۱۰ | ۷۳ | ۲/۴ | ۳/۳ |
| ۱۲۵ | ۱۰ | ۱۲۰ | ۴/۶ | ۳/۸ |

جدول ۳- نتايج آزمون برون سنجش

| غلظت | دفعات تكرار | ميانگين | انحراف استاندارد | درصد ضريب |
|---|---|---|---|---|
| ۲۵ | ۱۰ | ۲۵ | ۱/۵۰ | ۵/۸ |
| ۷۵ | ۱۰ | ۷۶ | ۳/۴۳ | ۴/۵ |
| ۱۲۵ | ۱۰ | ۱۲۶ | ۵/۸۱ | ۴/۶ |

*صحت روش*

نتايج آزمون توازي نشان مي‌دهد كه نمونة ۱۴۰ ميكرومول در ليتر در رقت‌هاي ۱:۱، ۱:۲، ۱:۴، ۱:۸، ۱:۱۶ و ۱:۳۲ به ترتيب ۱۰۲، ۹۱، ۹۷، ۱۰۳، ۱۰۸و ۱۱۴ درصد ميزان مورد انتظار خوانده شده است. همچنين نتايج آزمون بازيافت با روش افزايش نمونه به استانداردها، بازيافت ۳/۹±۹۳ درصد و با روش افزايش استاندارد به نمونه‌ها، بازيافت ۴/۲±۹۱ درصد را نشان مي‌دهد (جدول‌هاي ۲ و ۳ و ۴).

جدول ۴- نتايج آزمون توازي

| نسبت رقت | غلظت اوليه | مشاهده | مورد انتظار | درصد |
|---|---|---|---|---|
| ۱:۱ | ۱۴۰ | ۱۴۲ | ۱۴۰ | ۱۰۲ |
| ۱:۲ | ۷۰ | ۶۳ | ۷۰ | ۹۱ |
| ۱:۴ | ۳۵ | ۳۴ | ۳۵ | ۹۷ |
| ۱:۸ | ۱۷/۵ | ۱۸ | ۱۷/۵ | ۱۰۳ |
| ۱:۱۶ | ۸/۷۵ | ۹ | ۸/۷۵ | ۱۰۸ |
| ۳۲:۱ | ۴/۳۷ | ۵ | ۴/۳۷ | ۱۱۴ |
| | | | میانگین | ۱۰۲ |
| | | | انحراف استاندارد | ۳/۳ |

جدول ۵- نتايج آزمون بازيافت (افزايش نمونه به استانداردها)

| غلظت نمونه | غلظت استاندارد | مشاهده | مورد انتظار | درصد بازيافت |
|---|---|---|---|---|
| ۴۰/۸۴ | ۰ | ۲۰ | ۲۰/۴۲ | ۱۰۰ |
| ۴۰/۸۴ | ۲۵ | ۳۱ | ۳۲/۹۲ | ۹۵ |
| ۴۰/۸۴ | ۵۰ | ۴۲ | ۴۵/۴۲ | ۹۳ |
| ۴۰/۸۴ | ۷۵ | ۵۱ | ۵۷/۹۲ | ۸۸/۵ |
| ۴۰/۸۴ | ۱۰۰ | ۶۶ | ۷۰/۴۲ | ۹۵ |
| ۴۰/۸۴ | ۱۲۵ | ۷۵ | ۸۲/۹۲ | ۹۱ |
| ۴۰/۸۴ | ۱۵۰ | ۸۵ | ۹۵/۴۲ | ۸۹/۵ |
| | | | میانگین | ۹۳ |
| | | | انحراف استاندارد | ۱/۵ |

**جدول ۶- نتايج آزمون بازيافت (افزايش استاندارد به نمونه ها)**

| غلظت استاندارد | غلظت نمونه | مشاهده | مورد انتظار | درصد بازيافت |
|---|---|---|---|---|
| ۵۰ | ۴/۷۰ | ۲۳ | ۲۷/۳۵ | ۸۵ |
| ۵۰ | ۷/۱۸ | ۲۴ | ۲۸/۵۹ | ۸۶ |
| ۵۰ | ۱۹/۸۱ | ۳۱ | ۳۴/۹۰ | ۹۱ |
| ۵۰ | ۲۴/۱۸ | ۳۳ | ۳۷/۰۹ | ۹۱ |
| ۵۰ | ۳۱/۵۳ | ۳۷ | ۴۰/۷۶ | ۹۲ |
| ۵۰ | ۳۶/۷۵ | ۴۱ | ۴۳/۳۷ | ۹۵ |
| ۵۰ | ۴۴/۷۷ | ۴۵ | ۴۷/۳۹ | ۹۶ |
| ۵۰ | ۵۴/۷۲ | ۵۰ | ۵۲/۳۷ | ۹۶ |
| | | | میانگین | ۹۱ |

## بحث

نيتريك اكساید نيمه عمر كوتاهي در محيط *in vivo* دارد (كمتر از ۵ ثانيه) و از اين رو نيتريت و نيترات به عنوان شاخص توليد اكسيد نيتريك در بدن اندازه‌گيري مي‌شوند.[۱۷] اگرچه روش‌هاي مختلفي نظير روش‌هاي اسپكتروفتومتري ماوراي بنفش،[۲۰] كروماتوگرافي يوني،[۲۱] كروماتوگرافي مايع با كارايي بالا،[۲۲] كروماتوگرافي گاز ـ اسپكترومتري جرمي،[۲۳] و الكتروفورز مويينه[۲۴] براي اندازه‌گيري اين آنيون‌ها ارائه شده است، به طور كلاسيك اين آنيون‌ها با استفاده از واكنش گريس طي واكنش رنگ‌سنجي اندازه‌گيري مي‌شوند.[۲۵] در اين مطالعه اندازه‌گيري متابوليت‌هاي مرتبط با اكسيدنيتريك در سرم يعني نيتريت و نيترات [NOx] با استفاده از واكنش گريس انجام شد. نتايج اين مطالعه نشان مي‌دهد كه حساسيت روش ۲ ميكرومول در ليتر است. آقاي موشاگ و همكاران در اندازه‌گيري نيتريت پلاسما حساسيت روش را ۱/۵ ميكرومول در ليتر گزارش كرده‌اند.[۳] همچنين ريكارت ـ جين و همكاران نيز حساسيت روش را ۲-۱/۵ ميكرومول در ليتر گزارش نموده‌اند.[۱۳] البته حساسيت تا ۰/۵ ميكرومولار[۲۳] و حتي ۰/۱ ميكرومولار هم گزارش شده است.[۲۶] دربارة صحت اين روش، موشاگ و همكاران بازيافت ۹۰-۸۴ درصد را در تعيين نيتريت خون گزارش كرده‌اند.۳ نتايج اين مطالعه نشان داد كه بازيافت به روش افزايش نمونه به استانداردها ۱۰۰-۸۸/۵ (۹۳±۳/۹) درصد و در قسمت اضافه كردن استاندارد به نمونه‌ها ۹۶-۸۵ (۹۱±۴/۲) درصد است. آقاي گوارا و همكاران بازيافت ۶±۸۸ درصد را گزارش كرده‌اند.[۵] از طرفي نتايج آزمون توازي نتايج قابل قبولي تا رقت ۳۲ نشان مي‌دهد كه خود شاخص ديگري بر صحت روش است. ساير محققان دربارة دقت اين روش، ضريب تغييرات اندازه‌گيري در غلظت‌هاي پايين (كمتر از ۲۵ ميكرومولار) ۳/۷ درصد و در غلظت‌هاي بالا (تا۱۰۰ ميكرومولار) ۴/۱ درصد را گزارش كرده‌اند و در روش‌هاي بهينه شده اين اعداد تا ۱/۳ و ۲/۲ نيز كاهش داشته‌اند.[۵] در اين مطالعه ضريب تغييرات برون سنجش در غلظت‌هاي ۲۵، ۷۵ و ۱۲۵ ميكرومولار به ترتيب ۵/۸، ۴/۵ و ۴/۶ و ضريب تغييرات درون سنجش در غلظت‌هاي مذكور به ترتيب ۵/۵، ۳/۳ و ۳/۸ درصد است كه در محدودة قابل قبول دقت قرار دارند. مطابق جدول ۲ كارايي يا بازده پروتئين زدايي در اين مطالعه توسط اتانل بيش از ۹۰ درصد بوده است، در حالي كه با استفاده از سولفات روي تقريباً ۵۰ درصد پروتئين محيط قابل حذف بوده است. اين كارآيي دربارة استفاده از استات روي و فروسيانيد پتاسيم ۸۵ درصد گزارش شده است.[۱۲] در مجموع از آنجايي كه سنجش نيتريك اكساید در بسياري از پروژه‌هاي تحقيقاتي مطرح است، نياز به واردات كيت‌هاي نسبتاً گران قيمت مورد نظر است اما بر اساس نتايج حاصل از اين مطالعه مي‌توان گفت كه روش گريس با مشخصات ارائه شده براي اندازه‌گيري متابوليت‌هاي نيتريك اكساید از دقت و صحت قابل قبولي برخوردار است و مي‌توان براي اندازه‌گيري مقادير تا حد ۲ ميكرومول در ليتر از آن استفاده كرد. استفاده از اين روش ساده، سريع و ارزان بوده نياز به تجهيزات پيچيده‌اي ندارد و مي‌تواند سبب جلوگيري از خريد كيت‌هاي نسبتاً گران قيمت اندازه‌گيري اين متابوليت‌ها شود.

## سپاسگزاري

هزينة اين مطالعه توسط دانشگاه علوم پزشكي بقيه‌الله (عج) و مركز تحقيقات غدد درون‌ريز دانشگاه علوم پزشكي شهيد بهشتي تأمين شده است. مراتب تشكر و قدرداني از جناب آقاي دكتر صالح زاهدي اصل، سركارخانم دكتر مهري كدخدايي و سركار خانم دكتر مريم زحمتكش به خاطر راهنمايي‌هاي ارزنده شان ابراز مي‌گردد.

## References

1. Vallance P, Chan N. Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance.Heart 2001; 85: 342-50.
2. Garthwaite J, Charles SL, Chess-Williams R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain.Nature 1988; 336: 385-8.
3. Moshage H, Kok B, Huizenga JR, Jansen PL. Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation.Clin Chem 1995; 41: 892-6.
4. Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells.J Clin Invest 1989; 83: 1774-7.
5. Guevara I, Iwanejko J, Dembinska-Kiec A, Pankiewicz J, Wanat A, Anna P, et al. Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction.Clin Chim Acta 1998; 274: 177-88.
6. Inoue T, Kaibara M, Sakurai-Yamashita Y, Kawano M, Ishimaru T, Taniyama K. Increases in serum nitrite and nitrate of a few-fold adversely affect the outcome of pregnancy in rats.J Pharmacol Sci 2004; 95: 228-33.
7. Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule.Annu Rev Biochem 1994; 63: 175-95.
8. Kone BC, Baylis C. Biosynthesis and homeostatic roles of nitric oxide in the normal kidney.Am J Physiol 1997; 272: F561-78.
9. Singh S, Evans TW. Nitric oxide, the biological mediator of the decade: fact or fiction?Eur Respir J 1997; 10: 699-707.
10. Miranda KM, Espey MG, Wink DA. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite.Nitric Oxide 2001; 5: 62-71.
11. Granger DL, Taintor RR, Boockvar KS, Hibbs JB Jr. Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Griess reaction.Methods Enzymol. 1996; 268: 142-51.
12. Sun JZ, X Broderick, M Fein, H. Measurement of nitric oxide production in biological systems by using Griess reaction assay, Sensors, 3 (2003): 278-84.
13. Ricart-Jane D, Llobera M, Lopez-Tejero MD. Anticoagulants and other preanalytical factors interfere in plasma nitrate/nitrite quantification by the Griess method.Nitric Oxide 2002; 6: 178-85.
14. Vaziri ND, Ni Z, Oveisi F. Upregulation of renal and vascular nitric oxide synthase in young spontaneously hypertensive rats.Hypertension 1998; 31: 1248-54.
15. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.Anal Biochem 1976; 72: 248-54.
16. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids.Anal Biochem 1982; 126: 131-8.
17. Ellis G, Adatia I, Yazdanpanah M, Makela SK. Nitrite and nitrate analyses: a clinical biochemistry perspective.Clin Biochem 1998; 31: 195-220.
18. Marzinzig M, Nussler AK, Stadler J, Marzinzig E, Barthlen W, Nussler NC, et al. Improved methods to measure end products of nitric oxide in biological fluids: nitrite, nitrate, and S-nitrosothiols.Nitric Oxide 1997; 1: 177-89.
19. Priego T, Ibanez de Caceres I, Martin AI, Villanua MA, Lopez-Calderon A. NO plays a role in LPS-induced decreases in circulating IGF-I and IGFBP-3 and their gene expression in the liver.Am J Physiol Endocrinol Metab 2004;286:E50-6.
20. Misko TP, Schilling RJ, Salvemini D, Moore WM, Currie MG. A fluorometric assay for the measurement of nitrite in biological samples.Anal Biochem 1993;214:11-6.
21. Stratford MR, Dennis MF, Cochrane R, Parkins CS, Everett SA. The role of nitric oxide in cancer. Improved methods for measurement of nitrite and nitrate by high-performance ion chromatography.J Chromatogr A 1997; 770: 151-5.
22. El Menyawi I, Looareesuwan S, Knapp S, Thalhammer F, Stoiser B, Burgmann H. Measurement of serum nitrite/nitrate concentrations using high-performance liquid chromatography.J Chromatogr B Biomed Sci Appl 1998; 706: 347-51.
23. Kage S, Kudo K, Ikeda N. Determination of nitrate in blood by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry.J Chromatogr B Biomed Sci Appl 2000; 742: 363-8.
24. Zunic G, Spasic S, Jelic-Ivanovic Z. Simple and rapid method for the measurement of nitrite and nitrate in human plasma and cerebrospinal fluid by capillary electrophoresis.J Chromatogr B Biomed Sci Appl 1999; 727: 73-9.
25. Jedlickova V, Paluch Z, Alusik S. Determination of nitrate and nitrite by high-performance liquid chromatography in human plasma.J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2002; 780: 193-7.
26. Gharavi N, El-Kadi AO. Measurement of nitric oxide in murine Hepatoma Hepa1c1c7 cells by reversed phase HPLC with fluorescence detection.J Pharm Pharm Sci 2003; 6: 302-7.