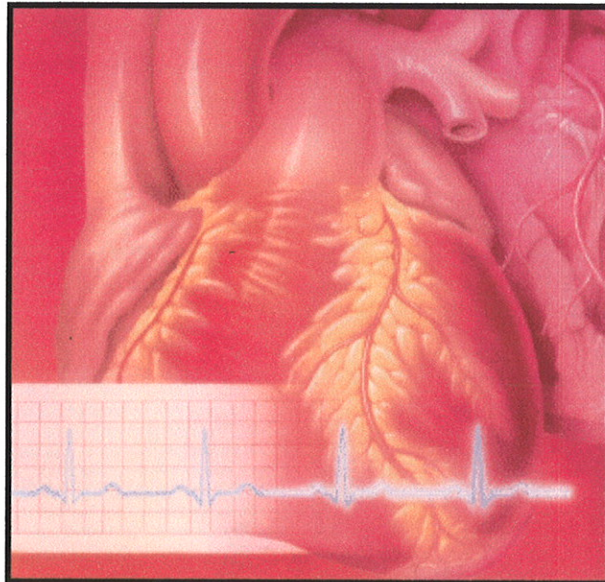


**ER NITROGENOKSIDNIVÅET  
I BLODET ENDRET VED ULIKE  
PATOLOGISKE TILSTANDER?**



5. årsoppgave for:

**Gaute Waldahl og Mette Røkenes**

Medisin kull - 99  
Det medisinske fakultet



Veiledere:

**Dag Ole Nordhaug, Tor Steensrud,  
Ebrahim Aghajani, Truls Myrmel**

Institutt for klinisk medisin  
Kirurgisk forskningslaboratorium

## **Innholdsfortegnelse**

<b>1. Bakgrunn</b>	<b>Side 3 - 4</b>
<b>2. Problemstilling og hypotese</b>	<b>Side 4</b>
<b>3. Materiale og metoder</b>	<b>Side 5 - 11</b>
- Kirurgisk preparering	
- Eksperimentell protokoll	
- NO – målinger	
<b>4. Resultater</b>	<b>Side 12 - 24</b>
- Indusert akutt ischemisk hjertesvikt	
- Cardioplegi	
- Indusert sepsis med endotoxin	
<b>5. Diskusjon</b>	<b>Side 25 - 26</b>
<b>6. Referanser</b>	<b>Side 27 - 29</b>

## 1. Bakgrunn

Nitrogenoksid (NO), er en lokalt virkende fri radikalgass som sannsynligvis kan mediere mange ulike kardiovaskulære effekter. NO blir in vivo dannet fra aminosyren L-Arginine av en familie enzymer kjent som nitrogenoksid syntetase (NOS). Tre former av NOS er beskrevet [1] og finnes i flere av kroppens vev, blant annet i vaskulær glatt muskulatur og i myocard [2]. I klinikken brukes nitrat-preparater for å avlaste hjertets arbeid ved at stoffene gir dilatasjon både på arteriell og venøs side. Nitroglycerin og nitroprusside virker ved å avgi NO til kroppens vev. NO aktiverer guanylate cyclase som gir økt cyclic 3'-5'-guanosine monophosphate (cGMP)-nivå i omkringliggende celler [3]. Hvordan cGMP påvirker intracellulære systemer er fortsatt uklart. Imidlertid antar man at cGMP aktiverer, direkte eller indirekte, ionepumper i cellemembranen, som igjen fører til lavere intracellulær konsentrasjon av  $Ca^{2+}$  og derved relaksjon av hjertemuskelen. I tillegg til dette blir det hevdet at cGMP kan interagere med myofilamentene i muskelcellene slik de  $Ca^{2+}$  - sensitiviteten påvirkes. Til nå er den best definerte effekten for NO relaksjon av glatt vaskulær muskulatur med påfølgende vasodilatasjon og avlastning av hjertets arbeid. På denne måten regulerer også NO den perifere motstanden i karsengen. En forutsetning for at NO skal fungere mest mulig effektivt er imidlertid at endotelet er intakt. Er dette skadet, som ved koronarsykdom, er det mye som tyder på at dette kan gi andre endringer, ved blant annet å redusere nitrogenoksid - nivået ved ulike tilstander [4,5]. I de senere årene er det publisert enkelte rapporter som hevder at stoffet også har en direkte virkning på myocards kontraktile funksjon. I isolerte hjerter, cellekulturer, in vivo i ulike dyr og på menneskehjerter er det vist at NO kan virke negativt inotrop [6-8]. I andre studier har man imidlertid observert en positiv inotrop effekt av NO. Det kan se ut som om NO påvirker hjertets kontraktilitet doseavhengig. Tilført NO i lave konsentrasjoner kan gi en svak positiv inotrop effekt, mens det i økte doser virker negativt inotrop [9]. Videre er det

ting som tyder på at nitrogenoksid kan påvirke hjertets diastoliske funksjon. Her spriker imidlertid de resultater som til nå er blitt beskrevet. Det er blant annet vist at NO øker diastolisk relaksjon i isolerte hjerter fra marsvin [10,11]. På den andre siden er det andre rapporter gjort på hund som tyder på at nitrogenoksid ikke modifiserte den diastoliske dysfunksjonen gjennom ischemi og reperfusjon [12].

Med bakgrunn i dette er NO mest sannsynligvis en svært sentral, men kompleks mediator for den kardiovaskulære funksjonen. De senere år er det gjort tallrike studier som forsøker å definere ulike effekter av NO ved ulike fysiologiske og patofysiologiske tilstander. Fortsatt er det svært mange spørsmål som står ubesvarte. Vi ønsket derfor å se nærmere på hvordan NO systemet ble påvirket i tre ulike patologiske settinger, nemlig ved induisert akutt ischemisk hjertesvikt, ved bruk av hjerte-lungemaskin og ved induisert sepsis.

## **2. Problemstillinger og hypotese**

NO er en sentral kardiovaskulær mediator som kan ha både positive og negative effekter i en patofysiologisk setting. Det er derfor viktig å kartlegge hva som skjer med den endogene NO-produksjonen ved ulike kardiovaskulære tilstander og intervensjoner. Vi har forsøkt å måle den sentralvenøse NO konsentrasjonen ved sepsis, akutt ischemisk hjertesvikt og ved bruk av hjerte- lungemaskin på griser. Vi satte opp følgende nullhypotese:

H0: Den sentralvenøse NO-konsentrasjonen er uendret ved sepsis, akutt ischemisk hjertesvikt og ved bruk av hjerte- lungemaskin i en eksperimentell grisemodell.

### **3. Materiale og metoder**

Forsøkene ble utført ved kirurgisk forskningslaboratorium, IKM, Universitetet i Tromsø, i nært samarbeid med 3 stipendiater og en seniorforsker ved avdelingen. De tre stipendiatene hadde allerede etablerte modeller og forsøksserier innenfor de tre aktuelle problemstillinger, nemlig akutt ischemisk hjertesvikt, sepsis og bruk av hjerte-lungemaskin. Vi gikk inn som medarbeidere i disse tre protokollene.

Alle forsøk ble utført i henhold til gjeldende nasjonale og internasjonale retningslinjer for arbeid med forsøksdyr og ble utført under oppsyn og veiledning av kyndig personell. Rent praktisk ble vår studie utført ved at vi tok blodprøver fra forsøksdyrene som stipendiatene brukte i sine protokoller, og gjorde videre analyser av disse.

#### **Kirurgisk preparering:**

Den kirurgiske preparering var tilnærmet identisk i de tre protokollene.

**Kastrerte griser av begge kjønn, vekt i henhold til stipendiatenes protokoller. Fastet over natten på dyreavdelingen med fri tilgang til vann.**

1. Ketamin 25mg/kg og atropin 1 mg i.m. på dyreavdelingen. Vask med grønnsåpe. Veing.
2. Induksjon av anestesi: Pentobarbital 10 mg/kg i.v. og fentanyl 0.01mg/kg i.v.
3. Trakeostomi og intubasjon med tube, ca.7,0. Volumstyrt ventilator  $Fi O_2 = 0,5$ . Volum og

frekvens justeres iht blodgassmålinger (PaCO<sub>2</sub> 4-6).

4. CVK i ve. v. jugularis ext. til væske- og medikamentinfusjoner.

5. CVK i hø. v. jugularis ext. for CVP-målinger.

6. Vedlikeholdsanestesi: Pentobarbital 4 mg/kg/t, fentanyl 0.02mg/kg/t, midazolam

0.3mg/kg/t på infusjonspumpe i CVK.

7. Væskeinfusjon: NaCl 0.9% med 1250 mg glucose/l i CVK, justeres iht diurese og blødning.

8. Cystostomi, timediuresesett.

9. Arteriekateter i hø. a. femoralis for uttaking av blodgasser.

10. Arteriekateter med trykkmåler i ve. a. femoralis for MAP.

11. Sternotomi.

12. Ligering av ve. v. hemiazygos.

13. Fridisseksjon av LAD, RCA og CX, samt tr. pulmonalis, påsetting av flowprober.
14. Innsetting konduktanskateter i ve. ventrikkel fra ve. a. carotis.
15. V.cardia magna-kateter fra v.cava supp. For blodgassmålinger.
16. Pulmonalarteriekateter fra hø. ventrikkel for MPAP-målinger og inj. ifm Vp-målinger.
17. Innsetting av 7F ballongkateter i hø v. femoralis for preloadjustering.
18. 2500IE heparin i.v. Gjentas en gang ilt forsøket. I hjerte- lungemaskinstudien  
heparinisering til ACT>480.
19. Pentobarbital reduseres til 3mg/kg/t (75 % av opprinnelig dose).
20. 30 minutter stabilisering.

## **Eksperimentell protokoll:**

**I** - Indusert akutt ischemisk hjertesvikt ved infusjon av 50  $\mu\text{m}$  polystyren mikrosfærer i venstre ventikkels hovedstamme. 5 mg bolusdose hvert 5.minutt inntil cardiac output er redusert med ca. 30-35%.

Plasmaprøver til NO-analyse tas fra vena cava superior på tre ulike tidspunkt.

T<sub>0</sub> : Etter avsluttet kirurgi.

T<sub>1</sub> : Etter mikroembolisering har gitt stabil ischemisk svikt.

T<sub>2</sub> : Umiddelbart etter NOS-blokade med 15  $\mu\text{g}/\text{kg}$  av NOS-blokkeren

L-NAME gitt i.v over 10 minutter.

**II** - Kanylerer arterielt via a. axillaris og venøst med two stage-kanyle i høyre atrium og går på hjerte-lungemaskin. Hjertet stoppes med blod kardioplegi, vanlig krytalloid eller med Nicorandil. (randomisering).

Tilsvarende plasmaprøver tatt.

T<sub>0</sub>: Etter avsluttet kirurgi.

T<sub>1</sub>: 1 time etter å ha gått av hjerte-lungemaskin.

T<sub>2</sub>: 2 timer etter å ha gått av hjerte-lungemaskin.



**III** - Indusert sepsis ved endotoxin (E.coli 026:B6) gitt som intermitterende infusjon i løpet av en time. Dosering 1,25 µg/kg, og totalt gitt omtrent 0,2 mg.

Tilsvarende plasmaprøver tatt.

T<sub>0</sub>: Etter avsluttet kirurgi.

T<sub>1</sub>: Etter infusjon av endotoxin.

### **NO-målinger:**

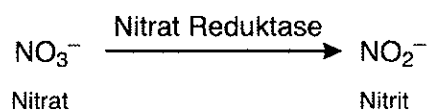
Blodprøvene ble sentrifugert ved 4200 rpm i 10 min ved 4 °C. Plasma pipetteres av.

Prøvene merkes og fryses ned ved -70 °C for senere analyser.

Analysen av NO-produkter (NO<sub>x</sub>) foretas med det kommersielt tilgjengelige Nitric Oxide Assay Kit, Fluorometric fra Calbiochem. Plasma ble først tilsatt buffer. Deretter tilsettes nitrat reduktase og derved reduseres nitrat til nitritt, figur 1. For å akselerere denne kjemiske prosessen ble enzym co-faktor tilsatt. Dette ble inkubert ved romtemperatur i 30 minutter. Endelig laget man en standardkurve ved hjelp av en nitratstandard som fulgte kitet. Det fluoriserende stoffet DAN (2,3-diaminoaftalen) ble tilført i alle brønnene og man inkuberte i nye 10 minutter, figur 2. Tilslutt tilsatte man NaOH og absorbansen ble avlest ved hjelp av spektrofotometret FLUOstar Galaxy fra BMG labtechnologies, ved institutt for farmasi ved Universitetet i Tromsø. For detaljert prosedyre se vedlegg 1.

Spektrofotometeret fungerer ved at det kan avlese absorbansen til et materiale, som er tilsatt et fluoriserende stoff. I vårt forsøk ble det brukt det fluoriserende stoffet DAN. Det som skjer er at prøvematerialet blir tilført elektromagnetisk stråling. På denne måten eksiteres atomer og molekyler. Deretter tilbakeføres de eksiterte elektroner tilbake til grunntilstanden og avgir

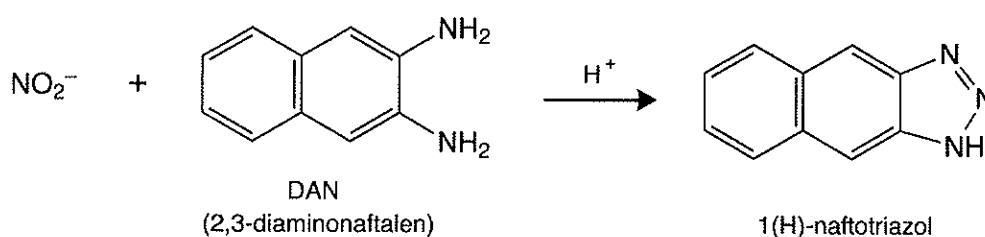
overflødig energi i form av fotoner. Dette registreres så av en detektor i spektrofotometeret og man får en avlesbar absorbans.



FIGUR 1

*Nitrat reduseres til nitritt ved hjelp av nitrat reduktase.*

Nitritt omdannes så til et fluorescerende stoff - 1(H)-naftotriazol, som så måles ved hjelp av et spektrofotometer:



FIGUR 2

*Nitritt reagerer med 2,3-diaminonaftalen og omdannes til det fluorescerende stoffet*

*1(H)-naftotriazol.*

Det lages en standardkurve ut fra en nitratstandard som følger med kit'et. Her plottes fluorescence mot nanomolar (nM) nitrat. Vi finner konsentrasjonen av nitrat i plasmaprøvene ved å lese av fra standardkurven når vi vet fluorescensen til plasmaprøvene.

Sentralvenøs NO-konsentrasjon indikerer hva som skjer med NO-systemet i organismen ved de ulike intervensjonene. Resultatene ble plottet i statistikkprogrammet SPSS og undergår analyse med to-utvalgs t-test. Beregning av standardkurver ble gjort ved bruk lineær regresjon i dataprogrammet Microsoft Excel. Dette danner dermed utgangspunkt for beregninger av konsentrasjonene i studiet.

Resultatene regnes som statistisk signifikant hvis  $P < 0,05$ .

## 4. Resulter

### I – Indusert akutt ischemisk hjertesvikt

#### Absorbans

Tabell 1:

Tabellen under viser absorbansen for 1(H)-naftotriazol før kirurgi (T0), ved stabil ischemisk svikt (T1) og etter NOS – inhibitoren L-NAME (T2).

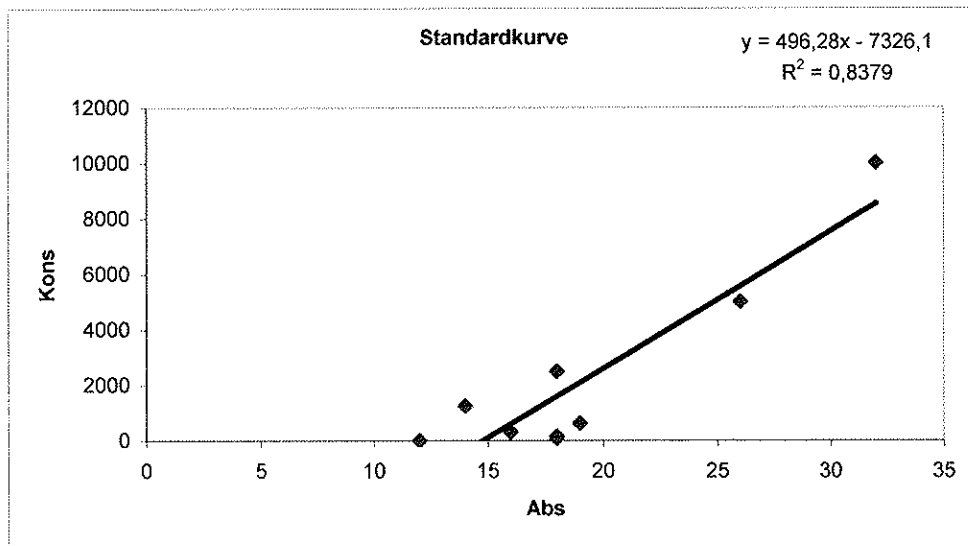
	<b>Dyr nr</b>	<b>T0</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>
<b>Kontroller</b>	1	25	23	13
	2	27	22	34
	3	16	31	24
	5	26	20	22
	9	24	22	27
	81	33	29	27
	82	40	42	13
<b>L-NAME</b>	28	32	27	17
	29	37	29	29
	70	41	34	31
	74	37	29	33
	76	34	35	26
	78	18	27	31

## Standardkurve

Tabell 2:

Tabellen er laget ut fra en nitratstandard som fulgte settet.

<b>ABSORB</b>	12	18	18	16	19	14	18	26	32
<b>KONS</b>	0	78	156	313	625	1250	2500	5000	10000



FIGUR 3

*Standardkurve laget med utgangspunkt i tabell 2. Absorbansverdiene er plottet inn i skjemaet og derved fremkommer konsentrasjonen til nitrat.*

Med utgangspunkt i standardkurven får vi følgende konsentrasjoner for våre prøver:

Tabell 3:

Tabellen viser konsentrasjonen av nitrat i nanomolar (nM) for de ulike tidspunkt.

	<b>Dyr nr</b>	<b>T0</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>
<b>Kontroller</b>	1	5074	4082	-878
	2	6066	3586	9538
	3	610	8050	4578
	5	5570	2594	3586
	79	4578	3586	6066
	81	9042	7058	6066
	82	12514	13506	-878
Gjennomsnitt		6208	6066	4011
SD		3731	3842	3814
<b>L-NAME</b>	28	8546	6066	1106
	29	11026	7058	7058
	70	13010	9538	8050
	74	11026	7058	9042
	76	9538	10034	5570
	78	1602	6066	8050
Gjennomsnitt		9125	7637	6479
SD		3986	1730	2882

Tabell 4:

Tabellen viser resultatene etter at vi har sammenliknet prøvene før kirurgi (T0) og etter stabil ischemisk svikt (T1), samt T1 og etter infusjon av NOS – inhibitoren L-NAME.

Populasjonsgjennomsnittene er sammenliknet med to – utvalgt t – test. Derav utregnes p - verdien.

	Dyr nr	T0-T1	T1-T2		T0-T1	T1-T2
<b>Kontroller</b>	1	-992	-4960			
	2	-2480	5952			
	3	7440	-3472			
	5	-2976	992			
	79	-992	2480			
	81	-1984	-992			
	82	992	-14384			
Snitt		-142	-2055	p-verdi	p-verdi	
SD		3585	6552	0,92	0,44	
<b>L-NAME</b>	28	-2480	-4960			
	29	-3968	0			
	70	-3472	-1488			
	74	-3968	1984			
	76	496	-4464			
	78	4464	1984			
	Snitt		-1488	-1157	p-verdi	p-verdi
SD		3364	3052	0,33	0,40	

Av tabellen over ser vi at det ikke er signifikante endringer i sentralvenøs NO konsentrasjon verken hos kontroll dyr eller dyr behandlet med NOS inhibitoren L-NAME gjennom forsøket. Sammenlikner vi kontroller og NOS-inhiberte dyr kun på T2 får vi en p-verdi på 0,76. NOS-inhiberte dyr har altså tilsynelatende ingen redusert NO konsentrasjon i sentralvenøst blod.



## II – Cardioplegi

### Absorbans

Tabell 5:

Tabellen under viser absorbansen for 1(H)-naftotriazol før kirurgi (Tid 0), 1 time etter å ha gått av hjerte-lungemaskin (Tid 1) og 2 timer etter å ha gått av hjerte-lungemaskin (Tid 2), for ulike grupper.

	Dyr nr	T0	T1	T2
<b>Krystalloid</b>	12	14,5	13,5	14,5
	68	17,5	12,5	14,5
	16	15,5	15,5	17,5
	8	13,5	14,5	13,5
<b>Nicorandil</b>	98	22,5	19,5	8,5
	4	24,5	32,5	19,5
	50	33,5	17,5	49,5
	56	21,5	17,5	54,5
<b>Blod cardioplegi</b>	96	112,5	11,5	13,5
	10	23,5	182,5	71,5
	18	24,5	27,5	20,5
	52	13,5	14,5	15,5
	54	18,5	22,5	11,5
	58	30,5	27,5	0,05

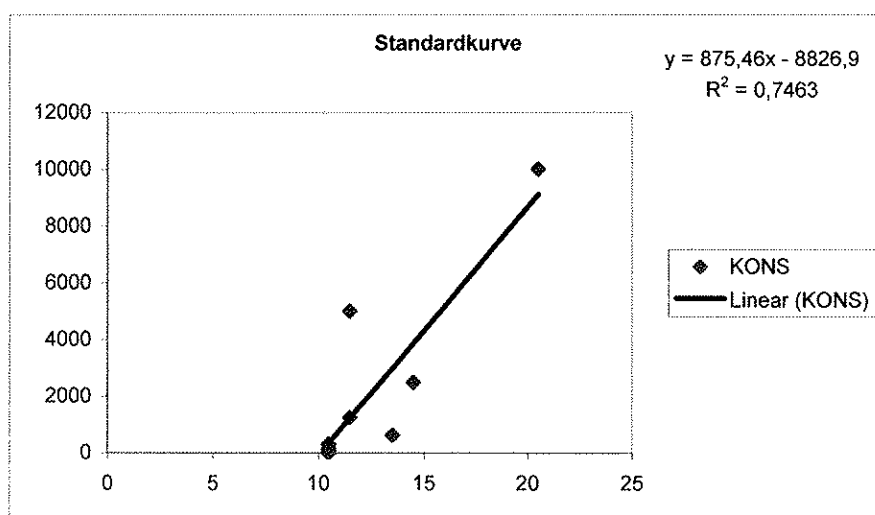
## Standardkurve

Tabell 6:

Tabellen er laget ut fra en nitratstandard som fulgte settet.

<b>KONS</b>	0 nm	78 nm	156 nm	313 nm	625 nm	1250 nm	2500 nm	5000 nm	10000 nm
<b>ABSORB</b>	10,5	10,5	10,5	10,5	13,5	11,5	14,5	11,5	20,5

Ut fra denne tabellen får vi følgende standardkurve:



FIGUR 4

*Standardkurve laget med utgangspunkt i tabell 6. Absorbansverdiene er plottet inn i skjemaet og derved fremkommer konsentrasjonen til nitrat.*

Med utgangspunkt i standardkurven får vi følgende konsentrasjoner for våre prøver:

Tabell 7:

Tabellen viser konsentrasjonen av nitrat i nanomolar (nM) for de ulike tidspunkt.

	<b>Dyr nr</b>	<b>T0</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>
<b>Krystalloid</b>	12	3861	2986	3861
	68	6486	2111	3861
	16	4736	4736	6486
	8	2986	3861	2986
Snitt		4517	3423	4298
SD		1494	1130	1516
<b>Nicorandil</b>	98	10861	8236	-1390
	4	12611	19611	8236
	50	20486	6486	34486
	56	9986	6486	38861
Snitt		13486	10204	20048
SD		4793	6325	19676
<b>Blod kardioplegi</b>	96	89611	1236	2986
	10	11736	150861	53736
	18	12611	15236	9111
	52	2986	3861	4736
	54	7361	10861	1236
	58	17861	15236	-8783,3
Snitt		23694	32881	10503
SD		32682	58087	21994

Tabell 8:

Tabellen viser resultatene etter at vi har sammenliknet prøvene før kirurgi (T0) og 1 time etter å ha gått av hjerte-lungemaskin (T1), samt T1 og 2 timer etter å ha gått av hjerte-lungemaskin.

Populasjonsgjennomsnittene er sammenliknet ved bruk av to – utvalgt t – test.

	<b>Dyr nr</b>	<b>T0-T1</b>	<b>T1-T2</b>
<b>Krystalloid</b>	12	-875	875
	68	-4375	1750
	16	0	1750
	8	875	-875
Snitt		-1094	875
SD		-365	386
<b>Nicorandil</b>	98	-2625	-9625
	4	7000	-11375
	50	-14000	28000
	56	-3500	32375
Snitt		-3281	9844
SD		1532	13351
<b>Blod Kardioplegi</b>	96	-88375	1750
	10	139125	-97125
	18	2625	-6125
	52	875	875
	54	3500	-9625
	58	-2625	-24019
Snitt		9188	-22378
SD		25405	-36093

Tabell 9:

Tabellen viser p-verdien ved sammenlikning mellom gruppene. Utrekningene er gjort med utgangspunkt i resultatene fra tabell 8.

T0-T1 gruppe 1 vs gruppe 2	p-verdi	0,59
T1-T2 gruppe 1 vs gruppe 2	p-verdi	0,48
T0-T1 gruppe 1 vs gruppe 3	p-verdi	0,79
T1-T2 gruppe 1 vs gruppe 3	p-verdi	0,26
T0-T1 gruppe 2 vs gruppe 3	p-verdi	0,75
T1-T2 gruppe 2 vs gruppe 3	p-verdi	0,75

Tabell 10:

Tabellen viser p-verdien ved sammenlikning innad i gruppene. Utrekningene er gjort med utgangspunkt i resultatene fra tabell 8.

Gruppe 1 T0-T1	p-verdi	0,41
Gruppe 1 T1-T2	p-verdi	0,25
Gruppe 2 T0-T1	p-verdi	0,50
Gruppe 2 T1-T2	p-verdi	0,46
Gruppe 3 T0-T1	p-verdi	0,77
Gruppe 3 T1-T2	p-verdi	0,21

Også i denne gruppen finner vi, i vårt forsøk, at det ikke er noen forskjell i sentralvenøs NO konsentrasjon mellom gruppene eller innad i gruppene gjennom forsøket.

### III – Indusert sepsis med endotoxin

#### Absorbans

Tabell 11:

Tabellen viser absorbansen for 1(H)-naftotriazol før kirurgi (T0) og etter infusjon av endotoxin.

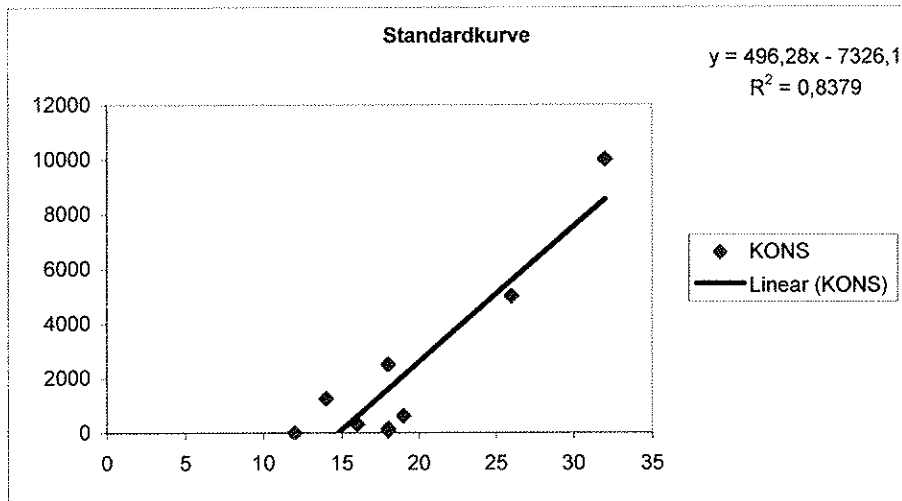
<b>Dyr nr</b>	<b>T0</b>	<b>T1</b>
172	28	36
173	50	49
174	31	30
176	29	34
177	31	23
99	43	46

#### Standardkurve

Tabell 12:

Tabellen er laget ut fra en nitratstandard som fulgte settet.

<b>ABSORB</b>	12	18	18	16	19	14	18	26	32
<b>KONS</b>	0	78	156	313	625	1250	2500	5000	10000



FIGUR 5

Standardkurve laget med utgangspunkt i tabell 12. Absorbansverdiene er plottet inn i skjemaet og derved fremkommer konsentrasjonen til nitrat.

Tabell 13:

Tabellen viser konsentrasjonen av nitrat i nanomolar (nM) ved de ulike tidspunkt.

Dyr nr	T0	T1
172	6562	10530
173	17474	16978
174	8050	7554
176	7058	9538
177	8050	4082
99	14002	15490
Snitt	10199	10695
SD	4466	4846

Ved bruk av to-utvalgs T-test og sammenlikner populasjonene T0 og T1, så gir dette en p-verdi på 0,86. Dette betyr at det ikke, i vårt forsøk, er noen forskjeller i sentralvenøs NO konsentrasjon mellom dyrene etter kirurgi og etter infusjon av endotoxin fra E. Coli.



## 5. Diskusjon

Vi finner altså ingen signifikante endringer i sentralvenøs NO konsentrasjon ved de tre beskrevne intervensjonene. Dette er overraskende, da tidligere studier har vist til dels store forandringer i NO konsentrasjon- og produksjon under lignende forhold. I en oppsummeringsartikkel kunne Ralph et al fortelle at NOS ekspresjonen økte i hjertet på pasienter med systemisk sepsis, likeså nivået av nitrat og nitritt [2]. Dette bekreftes av Tao et al som fant at NO – produksjonen økte samtidig med at kontraktiliteten gikk ned ved infusjon av endotoxin i rottehjerter [13]. Videre forteller studier fra Macdonald et al at NO produksjonen i myocard øker hos pasienter med hjertesvikt, som igjen kan føre til redusert kontraktilitet og myocyttskade. I den samme artikkelen ble det berettet om økte nivå av NOS i hjerter hos pasienter med hjertesvikt uansett underliggende årsak/sykdom [14]. Ferreiro et al kunne også i sine studier vise til økt ekspresjon av NOS hos pasienter med post - ischemisk hjertesvikt og man antok at dette kunne representere en modell for økt NO – produksjon ved hjertesvikt [15]. Denne studien blir understøttet av Node et al hvor man kunne påvise at pasienter med en stenose på over 90 % i proksimale deler av LAD får en økt NO – produksjon i hjertemuskel når de ble utsatt for treningsindusert stress [16]. En oppsummering av dette må derfor bli at det er mange studier som finner endringer i NO – konsentrasjonen ved ulike intervensjoner, noe som igjen dannet utgangspunktet for vår studie. Det kan derfor være flere årsaker til at vi ikke fant noen signifikant endring i sentralvenøs NO - konsentrasjon.

Våre funn kan selvsagt være korrekte, det vil si at vi ikke kan avvise nullhypotesen. Sett i lys av tidligere studier innenfor lignende områder [2, 13, 14, 15, 16] er det imidlertid vanskelig å konkludere sikkert med dette. Hvis vi for eksempel ser på Node et al sitt studie, som kanskje er det studiet som best kan sammenliknes med vår studiemodell. I dette materialet ble det tatt

prøver fra arterielt og venøst koronart blod. Dette ble gjort ved at pasienter med kjent angina og stenose på LAD ble sammenliknet med en kontrollgruppe uten koronarsykdom. Det viste seg at pasientene med angina fikk en signifikant økning i produksjonen av NO ( $p < 0,001$ ). Dette gjør at det er nærliggende for oss å forvente resultater, som til en viss grad kunne sammenliknes med resultatene til Node et al. Imidlertid kunne vi ikke vise til slike resultater og vi må derfor lete etter forklaringer på slike sprikende verdier.

I lys av dette er det nok flere mer nærliggende forklaringer på studiens resultater. Feil i vitenskapelige forsøk kan være tilfeldige eller systematiske, eventuelt kombinerte. Det kunne blant annet ha oppstått feil eller upålitelige målinger/resultater. Vi kan her vise til våre  $r^2$  - verdier i standardkurvene som er henholdsvis 0,74 og 0,84. Styrken på den lineære sammenhengen måles direkte med dette parameter. Vi har derfor en imperfekt positiv korrelasjon, og kun 74 % og 84 % sikkerhet i styrken på den lineære sammenhengen i våre standardkurver. Standardkurvene ble laget ut fra de standarder som fulgte kitet. Derfor skulle man forvente å få  $r^2$  - verdier som var tilnærmet 100 %. Dette oppnådde altså vi ikke i vårt studie.

I tillegg til dette kom noen av våre forsøksdyr ut med negative konsentrasjoner, noe som i den virkelige verden er en umulighet. Dette må sees som en konsekvens av at standardkurvene var uriktige. Dette vil ofte gjenspeile seg i verdier som henholdsvis enten er svært sprikende eller systematisk forskjøvet i forhold til virkelige verdier. I vårt tilfelle ser det dessverre ut som om tallene er svært sprikende, noe som altså tyder på at vi kan ha ulike tilfeldige feil i vårt materiale. Det kan her for eksempel dreie seg om feil bruk av kit, eller prosedyrefeil i form av feil i pipettering og behandling av prøver. Volumet det pipetteres på er dessuten svært små og

derived vil selv små unøyaktigheter få store konsekvenser for resultatene. Bruk av spektrofotometeret er også en annen mulig feilkilde, dog neppe den mest nærliggende. Apparatet skulle detektere fluorescensen av nitritkonsentrasjoner i nanomolar og små feil her ville derfor gi upålitelige tall. I denne sammenhengen kan vi også nevne at størrelsen på studien var begrenset. I ischemigruppen var det 13 dyr inkludert kontroller, i cardioplegigruppen var det 14 inkludert kontroller og i sepsisgruppen var det totalt 6 dyr. Dette gjør at materialet totalt sett var lite og dermed kan det være vanskelig å trekke konklusjoner på generelt grunnlag.

Det var også andre punkt i studien vår man kunne sette fingeren på. Deriblant preparering av prøver, det vil si sentrifugering og lagringsmetode, kan også ha bidratt til feilkilder. Prøvene ble blant annet tint opp da man skulle kjøre nye serier med prøver. I en av seriene oppdaget vi lite sammenfallende verdier og dårlige standardkurver, og tallene varierte svært mye med tallene etter første opptining. På grunnlag av dette mener vi at prøvene forringes etter gjentatte opptininger.

Det ble også kjørt en serie med et helt nytt kit, fra samme produsent, hvor vi ikke fikk absorbans verken på standardene eller på prøvene. Vi konkluderte med at det dreide seg om en feil med selve kitet, og vi valgte derfor å utelate disse resultatene i oppgaven.

Oppsummeringen på dette må derfor bli at det finnes mange ledd i studien vår hvor det kunne oppstå feilkilder. Det er vanskelig å peke på konkrete punkt hvor feilene har oppstått, det dreier seg heller kanskje om en kombinasjon av flere.

## 6. Referanser

- [1] Moncada S, Palmer RMJ, Higgs A. The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. *Hypertension* 1988;12:365-372.
  
- [2] Kelly RA, Balligand JL, Smith TW. Nitric oxide and cardiac function. *Circ Res* 1996; 79(3):363-380.
  
- [3] Furchgott RF, Cherry PD, Zawadzki JV, Jothianandan D. Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries. *J Cardiovasc Pharmacol* 1984; 6 Suppl 2:S336-S343.
  
- [4] Thomas F. Lüscher, MD; Chantal M. Boulanger, PhD; Zhihong Yang, MD; Georg Noll, MD; and Yasuaki Dohi, MD, PhD. Interactions Between Endothelium-Derived Relaxing and Contracting Factors in Health and Cardiovascular Disease. *Circulation* 1993;87[suppl]:V-36-V44.
  
- [5] Lionel H. Opie, MD, Dphil. The heart. *Physiology, from Cell to Circulation*. Third Edition 1998; 245-246, 276-277.
  
- [6] Keaney JF, Jr., Hare JM, Balligand JL, Loscalzo J, Smith TW, Colucci WS. Inhibition of nitric oxide synthase augments myocardial contractile responses to beta-adrenergic stimulation. *Am J Physiol* 1996; 271(6 Pt 2):H2646-H2652.

- [7] Flesch M, Kilter H, Cremers B, Lenz O, Sudkamp M, Kuhn-Regnier F et al. Acute effects of nitric oxide and cyclic GMP on human myocardial contractility. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;281(3):1340-1349.
- [8] Walter J. Paulus, MD, PhD. The role of Nitric Oxide in the Failing Heart. *Heart Failure Reviews* 2001; 6: 105-118.
- [9] Georg Kodja, Karin Kottenberg. Regulation of basal myocardial function by NO. *Cardiovascular Research* 1999; 514-523.
- [10] Grocott-Mason R, Fort S, Lewis MJ, Shah AM. Myocardial relaxant effect of exogenous nitric oxide in isolated ejecting heart. *Am J Physiol* 1994; 266: H1699-705.
- [11] Grocott-Mason R, Anning P, Evans H, Lewis MJ, Shah AM. Modulation of left ventricular relaxation in isolated ejecting heart by endogenous nitric oxide. *Am J Physiol* 1994; 267: H1804-13.
- [12] Stephan Christoph Ulrich Marsch et Al. Effects and Interactions of Nitrous Oxide, Myocardial Ischemia, and Reperfusion on Left Ventricular Diastolic Function. *Anesth Analg* 1997; 84:39-45.

- [13] Tao S, McKenna TM. In vitro endotoxin exposure induces contractile dysfunction in adult rat cardiac myocytes. *Am J Physiol.* 1994; 267: 1745 - 1752
- [14] Peter Macdonald, Christopher Schyvens and David Winlaw. The role of nitric oxide in heart failure. *Drugs and aging* 1996; 6: 452 – 458.
- [15] Ferreiro CR, Chagas AC, Carvalho MH, Dantas AP, Souza LC, Buffalo E, da Luz PL. Expression of inducible nitric oxide synthase is increased in patient with heart failure due to ischemic disease. *Braz J Med Biol Res* 2004sep; 37(9):1313 – 20.
- [16] Node K, Kitakaze M, Sato H, Koretsune Y, Karita M, Kosaka H, Hori M. Increased release of nitric oxide in ischemic hearts after exercise in patients with effort angina. *Am Coll Cardiol.* 1998 Jul; 32(1):63 – 8.

## Appendix

Forkortelser benyttet i oppgaven.

NO:	Nitrogenmonoksid.
NOS:	Nitrogenoksid syntetase.
cGMP:	cyclic 3' - 5'-guanosine monophosphate.
rpm	Runder per minutt
FiO <sub>2</sub> :	Oksygenfraksjonen i inspirasjonsluft.
CVK:	Sentralt venekateter.
CVP:	Sentralt venetrykk.
MAP:	Middel arterietrykk.
NaCl:	Natriumklorid.
LAD:	Venstre descenderende arterie.
RCA:	Høyre koronararterie.
CX:	Ramus circumflexus.
MPAP:	Middel pulmonalarterie trykk.
Vp:	Venetrykk.
ACT:	Activated clotting time, mål på grad av antikoagulasjon med heparin.
L-NAME:	N-nitro-L-arginine methyl ester. Ikke – selektiv inhibitor av nitrogenoksid syntetase.
E. Coli:	Escherichia Coli.
NO <sub>3</sub> -:	Nitrat.
NO <sub>2</sub> -:	Nitritt.
DAN:	2,3-diaminoaftalen.
SPSS:	Statistikkprogram for PC.

SD:

Standardavvik.

Kons:

Konsentrasjon.

Abs/absorb:

Absorbans.



## Nitric Oxide Assay Kit, Fluorometric

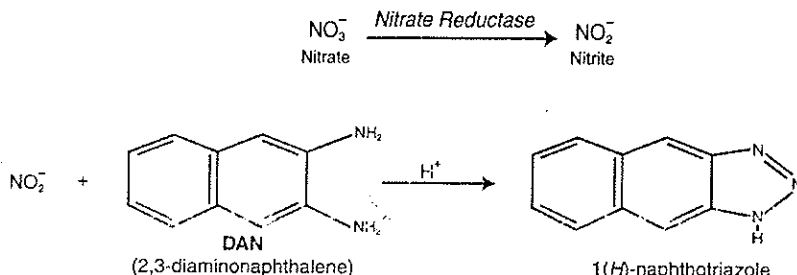
Cat. No. 482655

### Description

Nitric oxide (NO), produced in trace quantities by neurons, endothelial cells, platelets, neutrophils and other cells, acts as a unique second messenger molecule. It readily diffuses through cell membranes to exert a variety of biological actions in mammalian cells. Excess generation of NO lead to the formation of peroxynitrite, destruction of iron-sulfur clusters, thiol nitrosylation, and nitration of protein tyrosine residues. The final products of NO *in vivo* are nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) and nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ). The relative proportions of these two products are variable. Hence, the best index of total NO produced is the sum of both  $[\text{NO}_2^-]$  and  $[\text{NO}_3^-]$ .

### Principle of the Assay

CALBIOCHEM<sup>®</sup>'s fluorometric assay kit provides an accurate and convenient method for the measurement of total  $[\text{NO}_2^-]$  and  $[\text{NO}_3^-]$  in a simple two-step process. The first step involves the conversion of nitrate to nitrite by the enzymatic action of nitrate reductase. The second step involves the addition of 2,3-diaminonaphthalene (DAN) followed by NaOH to convert nitrite to a fluorescent compound 1(*H*)-naphthotriazole. Measurement of fluorescence of 1(*H*)-naphthotriazole provides an accurate assay of  $[\text{NO}_2^-]$



### Kit Components:

This Kit provides sufficient co-factors and reagents to run two 96-well microtiter plates measuring total NO ( $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ ) in all the wells. If you wish to test some samples for  $\text{NO}_2^-$  only (where reductase and cofactors are not required), there is sufficient DAN Reagent and NaOH to run a third 96-well plate of nitrite determinations. All three plates are supplied with this kit.

- ◆ Assay buffer: 1 x 2 ml
- ◆ Nitrate reductase: 2 x 100  $\mu\text{l}$
- ◆ Enzyme co-factors: 2 x 100  $\mu\text{l}$
- ◆ Nitrate standard: 1 x 100  $\mu\text{l}$
- ◆ Nitrite standard: 1 x 100  $\mu\text{l}$
- ◆ DAN reagent: 1 x 8 ml
- ◆ NaOH (2.8 M): 1 x 8 ml
- ◆ Microtiter plate: 3 plates
- ◆ Plate cover: 3 covers

Upon arrival, store kit at  $-20^\circ\text{C}$ .

*Note: For storage information of individual components following initial thawing and reconstitution, please consult the section on Pre-Assay Preparation.*

FOR RESEARCH USE ONLY. NOT FOR HUMAN OR DRUG USE. MSDS AVAILABLE UPON REQUEST.

### Materials Needed but not Provided

A fluorometric plate reader capable of measuring fluorescence  
(excitation = 365 nm; emission = 450 nm)

An adjustable pipette

Glass distilled or HPLC-Grade water

### Pre-Assay Preparation:

1. **Assay Buffer:** Dilute the contents of the vial to 100 ml with HPLC-Grade water. Use this buffer for diluting samples, as needed, prior to assay. Store at +4°C.
2. **Nitrate Reductase:** Reconstitute the contents of vial with 1.2 ml of assay buffer. Keep on ice during use. Aliquot and store at -20°C. **Allow only one time freezing and thawing of this solution.**
3. **Enzyme Co-factors:** Reconstitute the contents of this vial with 1.2 ml of assay buffer. Keep on ice during use. Aliquot and store at -20°C. **Allow only one time freezing and thawing of this solution.**
4. **Nitrate Standard:** Remove the vial stopper slowly to minimize disturbance of the lyophilized powder. Reconstitute the lyophilized nitrate standard using 1.0 ml of Assay Buffer. The concentration of this solution is 2 mM. Swirl to ensure that powder clinging to the sides of the vial is dissolved. Vortex gently. **Store all stock solutions at +4°C; do not freeze after reconstitution. When stored under these conditions, the nitrate standard is stable for at least three months.**
5. **Nitrite Standard:** Remove the vial stopper slowly to minimize disturbance of the lyophilized powder. Reconstitute the lyophilized nitrite standard using 1.0 ml of Assay Buffer. The concentration of this solution is 2 mM. Swirl to ensure that powder clinging to the sides of the vial is dissolved. Vortex gently. **Store all stock solutions at +4°C; do not freeze after reconstitution. When stored under these conditions, the nitrite standard is stable for at least three months.**
6. **Fluorometric reagent (DAN):** Ready to use. Store at +4°C. **Do not add water or assay buffer to this vial.**
7. **NaOH :** Ready to use. Store at +4°C. **Do not add water or assay buffer to this vial.**

### Plate Configuration:

There is no specific recommended pattern for using the wells on the plate. However, nine wells will be required for the standard curve. For NO assay, when using tissue culture medium, the standard curve should also be prepared in the presence of the medium. If you plan to measure the total NO products (nitrate + nitrite), only the nitrate standard curve is required. If you wish to measure nitrite, then only the nitrite standard curve is needed. The remaining wells can be used for assay of samples.

### Useful Pipetting Tips:

- a) To maintain precise times of incubation and for saving time, use of a repipettor is recommended.
- b) Always use different tips for pipetting assay buffer, standards, samples and color development reagents.
- c) Before pipetting, equilibrate the pipette tip in the reagent to be used (i.e., fill the tip and expel the solution, repeat a couple of times).
- d) Do not touch the pipette tip to the reagents already in the well.

FOR RESEARCH USE ONLY. NOT FOR HUMAN OR DRUG USE. MSDS AVAILABLE UPON REQUEST.

## Sample Preparation:

- 1) **Culture Media:** Culture media such as RPMI 1640 may contain high levels of nitrate. It is best not to use these types of media, particularly when small changes in nitrate levels are measured. If it is absolutely necessary to use this type of medium then cellular nitrate/nitrite levels can be quantitated by subtracting the level of nitrate/nitrite in the medium (in the absence of cells) from the total levels. Phenol red and fetal bovine serum (FBS) added to the medium can cause a significant reduction in fluorescence. Whenever possible these components should be avoided. The effect of media components on fluorescence intensity must be assessed by making the nitrate or nitrite standard curve in the presence of an equivalent amount of the phenol red or FBS. To obtain maximum signal response, it is best to use 10 or 20  $\mu\text{l}$  sample volumes. Use of larger sample volumes (30 to 50% of the final reaction volume) can lead to quenching of fluorescence.

To prepare a standard curve in the presence of media, simply prepare the nitrate or nitrite standard curve substituting the amount of media desired in the place of assay buffer. For the measurement of nitrate plus nitrite an incubation period of hour is required for the reaction to reach completion.

- 2) **Plasma or Serum:** Ultrafilter plasma or serum samples through a 10 kDa cut-off filter using a commercially available centrifuge or microfuge ultrafiltration device. This procedure removes hemoglobin thereby avoiding the reduction in fluorescence intensity. Assay for nitrate and/or nitrite using a maximum of 10  $\mu\text{l}$  filtrate. The conversion of nitrate to nitrite requires 1-2 hours (for  $\geq 95\%$  conversion).
- 3) **Tissue Homogenates:** Homogenize the sample in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) and centrifuge at 100,000 x g for 20 minutes. Ultrafilter the supernatant through a 10 kDa cut-off filter. Use 10  $\mu\text{l}$  of the filtrate for nitrate and/or nitrite assay. The conversion of nitrate to nitrite requires about 2 hours (for  $\geq 95\%$  conversion).

## Measurement of Nitrate + Nitrite

**Preparation of Nitrate Standard Curve:** A nitrate standard curve must be performed in order to quantitate sample nitrate + nitrite concentrations. In a clean test tube, place 900  $\mu\text{l}$  of Assay Buffer. To this, add 100  $\mu\text{l}$  of reconstituted nitrate standard and vortex. Use this diluted standard (200  $\mu\text{M}$ ) for the preparation of the nitrate standard curve as described below.

Obtain 8 clean test tubes and label them as 1 through 8. Aliquot 950  $\mu\text{l}$  of assay buffer to tube 1 and 500  $\mu\text{l}$  of assay buffer to tubes 2 through 8. Transfer 50  $\mu\text{l}$  of nitrate standard into test tube 1 and mix well. The concentration of standard in tube 1 is 10  $\mu\text{M}$ . Serially dilute the nitrate standard by removing 500  $\mu\text{l}$  volume from tube 1 and placing in tube 2. Mix well. Then remove 500  $\mu\text{l}$  from tube 2 and place it in tube 3. Repeat the procedure with tubes 4 to 8. After each addition mix well. **Do not store the diluted standards for more than 24 hours.**

Test Tube Number	Nitrate Standard Concentration ( $\mu\text{M}$ )	Nitrate (pmol/well)
1	10	500
2	5	250
3	2.5	125
4	1.25	62.5
5	0.625	31.3
6	0.313	15.6
7	0.156	7.8
8	0.078	3.9

FOR RESEARCH USE ONLY. NOT FOR HUMAN OR DRUG USE. MSDS AVAILABLE UPON REQUEST.

### Performing the Assay

- 1) **Aliquoting the Standards for the Standard Curve:** Reserve nine wells on the plate for each standard curve (for better data we recommend running standards in duplicate) [Note: if you use a single cell spectrofluorometer, perform all reactions in small test tubes.] Add 80  $\mu$ l of the assay buffer to the first standard well and 30  $\mu$ l to each of the remaining eight. Add 50  $\mu$ l of nitrate standard from test tube #8 to the second standard well on the plate. Then add 50  $\mu$ l from test tube #7 to the third standard well. Continue this process for test tube #6, 5,4,3,2, and 1.
- 2) **Aliquoting the Samples:** Add 10 – 20  $\mu$ l of sample to the wells and adjust the volume to 80  $\mu$ l with Assay Buffer. [Note: For plasma samples and tissue homogenates, use no more than 10  $\mu$ l of undiluted plasma or filtrate per well.] Avoid any bubbles from entering the wells.
- 3) **Aliquoting the Enzyme Co-Factors:** Add 10  $\mu$ l of the enzyme co-factors to each well.
- 4) **Aliquoting the Nitrate Reductase:** Add 10  $\mu$ l of the nitrate reductase to each well.
- 5) **Incubation:** Cover the plate with the plate cover and incubate at room temperature for 30 minutes. This incubation period should be increased to 1 hour when assaying tissue culture medium or 2 hours when assaying plasma and tissue samples.
- 6) **Aliquoting DAN:** After the required incubation period add 10  $\mu$ l of DAN reagent to each well and incubate for 10 minutes.
- 7) **Aliquoting NaOH:** Add 20  $\mu$ l of NaOH to each well.
- 8) **Reading the Plate:** Read the plate in a fluorometer using the excitation wavelength of 375 nm and an emission wavelength of 415 nm. Alternatively, excitation and emission wavelengths of 360-365 and 430-450 nm, respectively, can be used. (Any emission wavelength above 450 nm cannot be used.) When using a single cell spectrofluorometer, dilute the sample to 2 to 3 ml to allow for the measurement of all the samples. Higher concentrations of nitrate and nitrite may require lower gain setting, whereas the gain may need to be increased for low concentrations of nitrate and nitrite.

*Blank: 100  $\mu$ l Buffer*

### Measurement of Nitrite

**Preparation of Nitrite Standard Curve and Samples:** Follow the nitrate standard curve preparation instructions (see above) using the nitrite standard vial. If using a single cell fluorometer, perform all reactions in small test tubes.

### Performing the Assay

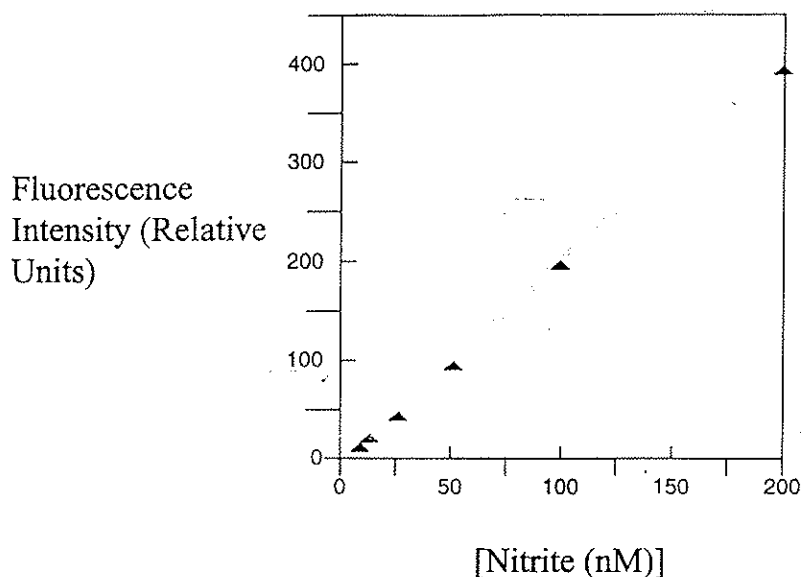
- 1) **Aliquoting the Standards for the Standard Curve:** Reserve nine wells on the plate for each standard curve (for better data we recommend running standards in duplicate) [Note: if you use a single cell spectrofluorometer, perform all reactions in small test tubes.] Add 100  $\mu$ l of the assay buffer to the first standard well and 50  $\mu$ l to each of the remaining eight. Add 50  $\mu$ l of nitrate standard from test tube #8 to the second standard well on the plate. Then add 50  $\mu$ l from test tube #7 to the third standard well. Continue this process for test tube #6, 5,4,3,2, and 1.
- 2) **Aliquoting the Samples:** Add 10 – 20  $\mu$ l of sample to the wells and adjust the volume to 100  $\mu$ l with Assay Buffer. [Note: For plasma samples and tissue homogenates, use no more than 10  $\mu$ l of undiluted plasma or filtrate per well.] Avoid any bubbles from entering the wells.
- 3) **Aliquoting DAN:** After the required incubation period add 10  $\mu$ l of DAN reagent to each well and incubate for 10 minutes.
- 4) **Aliquoting NaOH:** Add 20  $\mu$ l of NaOH to each well.
- 5) **Reading the Plate:** Read the plate in a fluorometer using the excitation wavelength of 365 nm and an emission wavelength of 450 nm. Alternatively, excitation and emission wavelengths of 375 and 415 nm, respectively, can be used. **Do not use emission wavelengths above 450 nm.** When using a single cell spectrofluorometer, dilute the sample to 2 to 3 ml to allow for the measurement of all the samples. Higher concentrations of nitrate and nitrite may require lower gain setting, whereas the gain may need to be increased for low concentrations of nitrate and nitrite.

FOR RESEARCH USE ONLY. NOT FOR HUMAN OR DRUG USE. MSDS AVAILABLE UPON REQUEST.

## Calculations

**Plotting the Standard Curve:** Make a plot of fluorescence vs. nanomoles of nitrate or nitrite. The nitrite standard curve is used for determination of total nitrate plus nitrite concentrations, whereas the nitrite standard curve is used for the determination of nitrite alone. In theory, these two standard curves should be identical, however, in practice a small discrepancy is often observed.

Fluorescence measurements have the advantage of measuring a broad linear range. Hence, the standard curve is prepared using serial dilutions of a stock standard. It may be necessary to expand or reduce the scale in instances where extremely low or high levels of nitrate and/or nitrite are measured. A typical standard curve is shown below:



## Determination of Sample Nitrite Concentrations

$$[\text{Nitrite (nM)}] = \left( \frac{\text{Fluorescence} - y \text{ intercept}}{\text{Slope}} \right) \left( \frac{1}{\text{Volume of sample used (ml)}} \right) \times \text{dilution}$$

FOR RESEARCH USE ONLY. NOT FOR HUMAN OR DRUG USE. MSDS AVAILABLE UPON REQUEST.

## Interferences

Fluorescence measurements are generally more susceptible to interferences compared to most absorbance measurements. Hence, it is necessary to include appropriate controls that can account for agents that may cause quenching. Known interfering agents are hemoglobin, fetal calf serum, bovine serum albumin, DTT, NADPH, and phenol red. The NADPH concentration in this assay is kept below 1  $\mu\text{M}$  to eliminate this interference. Whenever possible, other known interfering reagents should be eliminated from tissue culture media. Most proteins from plasma, serum, or tissue homogenates are removed by using the 10 kDa cut-off filters.

## Sensitivity

This fluorometric assay will detect as little as 10-30 nM nitrite in the final reaction mixture (< 4 pmol in 130  $\mu\text{l}$ ). When using 20  $\mu\text{l}$  sample, the detection limit for nitrite in the original sample is 0.2  $\mu\text{M}$ .

## Troubleshooting

Problem	Cause	Solution
Erratic values; dispersion of duplicates.	Poor pipetting, poor techniques.	Check pipette accuracy.
No fluorescence in nitrate standard curve.	Co-factors and /or nitrate reductase are not added; DAN or NaOH are not added.	Add DAN and/or NaOH, if they are not added. If the co-factors and/or nitrate reductase are not added, then a new standard curve has to be prepared. If you have not added one of these reagents to the sample wells, you will have to repeat the experiment.
The nitrate standard curve is not linear at high concentrations.	Incomplete conversion of nitrate to nitrite at higher concentrations.	Use only the points on the lower nitrate concentrations for making the standard curve. Allow the enzymatic reaction to proceed for longer duration next time.

## References:

- Miles, A.M., et al. 1995. *Methods* 7, 40.  
Misko, T.P., et al. 1993. *Anal. Biochem.* 214, 11.  
Green, L.C., et al. 1982. *Anal. Biochem.* 126, 131.

FOR RESEARCH USE ONLY. NOT FOR HUMAN OR DRUG USE. MSDS AVAILABLE UPON REQUEST.