

УДК 57.089.2

О.В. КИСЛОВА

Київський національний університет технологій та дизайну

**ПЕРЕВАГИ ВИКОРИСТАННЯ ЕЛЕКТРОДІВ КЛАРК-ТИПУ
ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ НІТРОГЕН(II) ОКСИДУ ТА ВМІСТУ
ЙОГО СТАБІЛЬНИХ МЕТАБОЛІТІВ - НІТРИТ- ТА НІТРАТ-АНІОНІВ
В БІОЛОГІЧНИХ ЗРАЗКАХ**

У статті наведено основні методи прямого визначення концентрації регулятора біологічних процесів нітроген(II) оксиду та його стабільних метаболітів - нітрит- та нітрат-аніонів як маркерів функціонування NO-синтазної системи. Показано переваги визначення цих показників електрохімічним методом з використанням електродів Кларк-типу.

Ключові слова: нітроген(II) оксид, нітрит- та нітрат-аніони, електроди Кларк-типу.

Відкриття та ідентифікація нітроген(II) оксиду NO як біологічного медіатора стало початком розвитку нового напрямку в дослідженні регуляції функцій клітин [1]. Ця сполука є нестабільним радикалом, який має один неспарений електрон [2]. Час напівжиття NO у водних розчинах *in vitro* складає від 500 с до декількох годин, а в умовах *in vivo* не перевищує 5 с. У більшості випадків це пов'язано з великою швидкістю реакції окиснення нітроген(II) оксиду в умовах *in vivo* і менш швидким (з напівперіодом близько 10 с) метаболізмом з утворенням кінцевих стійких продуктів – нітритів і нітратів, які є непрямими маркерами концентрації NO в організмі [3].

Спектр біологічної дії NO охоплює функціонування систем внутрішньоклітинної та міжклітинної сигналізації [1,4]. Так, він є нейротрансмітером центральної та периферичної нервової системи, відповідає за розслаблення судин (є вазодилататором), регулює діяльність серцево-судинної системи, запобігає агрегації тромбоцитів та адгезії нейтрофілів до ендотелію, впливає на процеси навчання та пам'яті. Недостатність продукції клітинами NO викликає посилення констрикції судин та характерно для таких захворювань, як гіпертонія, ішемічна хвороба серця, цукровий діабет та інші [4].

Проте NO та продукти його метаболізму є реакційно – активними речовинами, значні концентрації яких здатні викликати пошкодження структури ДНК, інгібувати активність ряду ферментів, знижувати антиоксидантний потенціал клітин, індукувати процеси перекисного окиснення ліпідів та викликати інші негативні зміни в функціонуванні організму [1,4].

Об'єкти та методи дослідження

Для проведення дослідів придатний широкий спектр біологічних рідин, а також безбілкові супернатанти гомогенатів різних тканин та органів. Концентрацію ендogenous нітроген(II) оксиду та продуктів його окиснення визначають електрохімічним методом за допомогою електроду Кларк-типу.

Постановка завдання

Розробка універсального, надійного, простого та чутливого методу для кількісного визначення ендogenous нітроген(II) оксиду в фізіологічних концентраціях та його стабільних метаболітів - нітрит- та нітрат-аніонів, що є передумовою для кращого розуміння та подальшої корекції процесів, які супроводжують діяльність організму.

Результати та їх обговорення

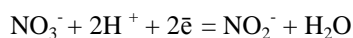
Для визначення концентрацій нітроген(II) оксиду та його метаболітів розроблено багато різних методів, проте жодний з них не дає можливості проводити визначення всіх трьох хімічних речовин (NO в момент його виділення, NO₂⁻ та NO₃⁻ через певний проміжок часу) в одній пробі.

Так, для прямого визначення концентрації NO нині використовуються декілька різних методів, проте вони залучають складне і дороге обладнання, або є недостатньо специфічними та чутливими.

Основу електронного парамагнітного резонансу складає аналіз спектрів нітрозильних ферумвмісних комплексів [5]. Акцепторами NO-радикалів є відновлені форми гемоглобіну і похідні дитіокарбамінової кислоти. Проте чутливість методу для визначення ендogenous нітроген(II) оксиду є недостатньою. Принцип хемілюмінесцентного методу полягає у кількісному визначенні фотонів, які генеруються при протіканні реакції NO з озоном [6]. Наступний метод заснований на спектрофотометричному визначенні вмісту метгемоглобіну, який утворюється при взаємодії оксигемоглобіну з NO. Істотним недоліком цих методів є необхідність очищення досліджуваних проб від ендogenous гемоглобіну і сполук, що здатні його окиснювати нітроген(II) оксид [6].

Стабільними кінцевими продуктами окиснення нітроген(II) оксиду в організмі є нітрит- і нітрат-аніони [2]. Їх вміст у біологічних зразках пропорційний продукції NO, який є їх єдиним ендogenous джерелом в організмі [3]. У зв'язку з тим, що молекула NO є короткоживуча, в лабораторній практиці широко прийнято досліджувати вміст його стабільних метаболітів.

Між нітратами та нітритами існує прямий зв'язок. У ході окисно-відновних реакцій вони можуть перетворюватись згідно наступного рівняння:



Кількісне визначення цих аніонів у біологічних зразках проводять різними методами. Найбільш розповсюдженими методами для визначення нітритів є флуориметричний та спектрофотометричний методи. Флуориметричний метод заснований на зміні флюоресценції 2,3-діамінонафталену після зв'язування його нітрит-іонами. Чутливість методу складає 100 нм, однак його застосування є можливим для визначення лише в культуральних середовищах [6].

Визначення вмісту нітриту в біологічних рідинах також здійснюють спектрофотометричним методом за допомогою різних модифікацій методу Гріса, заснованому на протіканні реакції утворення азобарвників при взаємодії з нітрит-аніоном. За цим методом можна визначити і сумарний вміст нітрит- та нітрат-аніонів після попереднього відновлення нітратів до нітритів дією різних відновників, зокрема ванадій(III) хлориду в кислому середовищі [7] або ферментативно за допомогою редуктази [8].

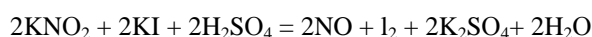
Останнім часом як за кордоном, так і в нашій країні випускають нітрат-селективні електроди різного типу [9]. Найбільш відомий електрод з рідкою мембраною (розчин іонних або нейтральних сполук в органічному розчиннику). Носієм може бути інертний полімер, наприклад, полівінілхлорид.

Наведені методи визначення нітритів та нітратів придатні для агрохімічного, меліоративного дослідження угідь, поточного контролю за станом ґрунтів та ґрунтових вод, аналізі продуктів харчування та питної води [9]. Проте чутливість цих методів недостатня для визначення динаміки змін концентрацій нітритів та нітратів ендogenous походження.

Новим перспективним методом визначення концентрації як нітроген (II) оксиду, так і продуктів його окиснення - нітрит- та нітрат-аніонів - є електрохімічний метод з використанням електродів Кларк-

типу. Метод заснований на використанні полімерного металопорфіринового електроду, який каталізує окиснення NO з наступною реєстрацією зміни електрохімічного потенціалу [10]. Електрод є високо специфічним, зручним у використанні, достатньо чутливим (у діапазоні до 10^{-9} М).

Принцип роботи даних сенсорів базується на тому, що газ проходить через газопроникну мембрану і тонку плівку електроліту та окиснюється на робочому електроді. Зареєстрований потенціал пропорційний концентрації сполуки з зовнішньої сторони мембрани. Калібрування електроду здійснюється хімічним методом при протіканні наступної окисно-відновної реакції:



Кількісне відновлення NO_2^- до NO в кислому середовищі дозволяє надійно калібрувати електрод.

Дані електроди нечутливі до O_2 , N_2 , CO та CO_2 , проте наявність NO_2 заважає проведенню вимірювань, оскільки в розчині нітроген(IV) оксид є нестабільною сполукою та швидко диспропорціонує на нітрити та нітрати.

Приготування розчинів для калібрування електроду здійснюють на дистильованій воді, з якої повністю видалено кисень в результаті пропускання протягом 10 хвилин потоку газоподібного гелію або аргону. Використовують наступні калібрувальні розчини: 0,1 М KI в 0,1 М H_2SO_4 ; 0,1 мМ KNO_2 .

Межа чутливості електроду складає 20 нМ з лінійною залежністю до 10 мкМ. Калібрувальна пряма описується наступним рівнянням $y = 0,27 x$. Отриманий фактор калібрування може використовуватися для кінцевих розрахунків концентрації.

Електрод необхідно калібрувати перед кожним використанням, оскільки зміна чутливості датчика перебуває в діапазоні 0,5 нМ/пА та змінюється в залежності від температури (~ 2 та ~ 4 нМ/пА при 25° і 37°C відповідно).

Калібрування також може бути виконано з використанням водних NO - стандартів, виготовлених з насиченого розчину NO. Але підготовка точних NO - стандартів забирає більше часу та вимагає повного видалення кисню. Воно доцільне тільки для проведення експериментів по визначенню виключно концентрації нітроген(II) оксиду в фізіологічних умовах.

Використання хімічних сполук – донорів NO – для калібрування електроду не бажане, тому що швидкість розкладання і стехіометрія вивільнення NO можуть змінюватися в залежності від умов інкубації, температури.

Тому для більшості досліджень калібрування електроду здійснюють з використанням наведеної вище окисно-відновної реакції відновлення нітритів.

В процесі експлуатації потрібно уникати пошкодження селективної мембрани, яка розташована на кінчику електрода. Ця мембрана захищає робочий електрод від іонів, які можуть окиснюватись і викликати появу побічного струму. Цілісність мембрани перевіряють при зануренні датчика електроду в сольовий розчин (струм має залишатись низьким і стабільним).

Крім збереження електроду від пошкодження, дуже важливим є підтримання чистоти мембрани. Низька чутливість або повільна відповідь датчика свідчать або про забруднення мембрани, або про необхідність заміни електроліту (вторинне наповнення датчика новим електролітом стає необхідним приблизно через 3 – 4 тижні).

Крім прямого визначення концентрації нітроген(II) оксиду електрод також дозволяє виміряти концентрацію нітритів та нітратів. Кількість нітрит-аніону визначають шляхом відновлення до NO хімічним методом в кислому середовищі (аналогічно калібруванню електроду).

Рівень нітратів окремо визначити неможливо. Тому нітрат-аніон попередньо відновлюють до нітрит-аніону за допомогою цинкового пилу або ванадій(III) хлориду [7]. З використанням електроду визначають сумарний вміст нітрит- та нітрат-аніонів.

Приготування біологічних зразків. Для проведення досліджень використовуються безбілкові супернатанти біологічних рідин та гомогенатів різних тканин.

Для отримання безбілкового супернатанту до біологічної рідини (наприклад, зразку крові) додають 5%-вий розчин перхлоратної кислоти на фосфатному буфері (pH=8,8) у співвідношенні 1:3.

Для приготування гомогенатів тканин зразок зважують, подрібнюють та розтирають у ступці після заморожування рідким азотом або в гомогенізаторі Поттера на льоду. До гомогенату додають 5%-вий розчин перхлоратної кислоти на фосфатному буфері (pH=8,8) у співвідношенні 1:7.

Утворену суміш ретельно перемішують та залишають на 10 хв., потім проби центрифугують при 3000 об/хв. протягом 15 хв. при 4°C. Надосадову рідину переносять в окремі сухі чисті пробірки і використовують для подальшого проведення досліджень [11,12].

Методика проведення вимірювання. Всі виміри проводяться при постійному перемішуванні.

В центр магнітної мішалки поміщають посуд для зразку об'ємом 1.8 мл. Для прямого визначення концентрації NO посуд заповнюють інкубаційним буфером об'ємом 1,6 мл, з якого повністю видаляють кисень пропусканням протягом 10 хвилин потоку газоподібного гелію або аргону. Для визначення концентрації нітратів та нітритів посуд заповнюють розчином для хімічного відновлення нітритів до NO (0,1 М KI в 0,1 М H₂SO₄) об'ємом 1,6 мл. Нітрати безбілкового супернатанту попередньо відновлюють до нітритів за допомогою ванадій(III) хлориду [7]. В цій пробі за результатами вимірів визначають сумарний вміст нітрат- і нітрит-аніонів. Концентрацію нітрат-аніону визначають як різницю між сумарним вмістом зазначених метаболітів та вмістом нітрит-аніону в пробі.

Для проведення вимірювань в центр посуду поміщають електрод та чекають, поки початковий струм не стане постійним і регулюють його на нульовий рівень. Повільно вводять безбілкові супернатанти (10–20 мкл) в посуд і фіксують силу струму. Використовуючи калібрувальну пряму розраховують концентрацію речовин.

Висновки

Отже, з огляду на важливість вивчення метаболізму нітроген(II) оксиду, насамперед його ролі в розвитку різних патологічних станів, актуальною проблемою є розробка надійних методів визначення концентрацій NO та його стабільних метаболітів - нітрит- та нітрат-аніонів у біологічних зразках різного походження. До переваг електрохімічного методу визначення цих показників з застосуванням електродів Кларк-типу належать:

- 1) можливість визначити безпосередньо як концентрацію нітроген(II) оксиду в момент його виділення, так і продуктів його окиснення в організмі – нітратів та нітритів;
- 2) простота проведення експерименту та невеликі витрати часу;
- 3) відносно недороге обладнання та легкість його обслуговування;

4) висока чутливість методу, яка дозволяє проводити виміри в наномолярному (фізіологічному) діапазоні;

5) висока селективність.

Список використаної літератури

1. Gewaltig M., Kojda G. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential// Cardiovasc.Res. – 2002. – V. 55. – P.250-260.
2. Hughes M. Chemistry of nitric oxide and related species // Methods. Enzymol. – 2008. – Vol. 436.– № 1. – P. 3-19.
3. Kowalczyk E., Kopff A., Kopff M., Błaszczak J., Fijałkowski P., Kowalski J. Nitric oxide metabolism // Wiad. Lek. – 2006. – Vol. 59. – № 11–12. – P. 889-893.
4. [Wang X.](#), [Tanus-Santos J.](#), [Reiter C.](#), [Dejam A.](#), [Shiva S.](#), [Smith R.](#), [Hogg N.](#), [Gladwin M.](#) Biological activity of nitric oxide in the plasmatic compartment// [Proc. Natl.Acad. Sci. USA.](#) – 2004. – № 3. – P. 101-109.
5. [Hogg N.](#) Detection of Nitric Oxide by Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy // Free Radic. Biol. Med. – 2010. – V. 49. – № 2. – P. 122-129.
6. [Planchet E.](#), [Kaiser W.](#) Nitric oxide (NO) detection by DAF fluorescence and chemiluminescence: a comparison using abiotic and biotic NO sources // [J.Exp. Bot.](#) – 2006. – V.57. – №12. – P. 3043-3055.
7. Miranda K., Espey M., Wink D. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite // Nitric. Oxide. – 2005. – Vol. 13. – № 2. – P. 93-97.
8. Whelan M. A colorimetric method for the quantitative determination of nitrates and nitrites in biologic fluids // J. Biol. Chem. – 2008. – № 7. – P. 189-197.
9. Shaw R., Williams A., Miller A., Jones D. Assessing the Potential for Ion Selective Electrodes and Dual Wavelength UV Spectroscopy as a Rapid on-Farm Measurement of Soil Nitrate Concentration // Agriculture. – 2013. – №3. – P. 327-341.
10. Allen B., Coury L., Piantadosi C. Electrochemical detection of physiological nitric oxide: Materials and methods // Methods Enzymol. – 2002. – Vol. 359. – P. 125-134.
11. Ivanova I., Kislova O., Soloviev A. Endothelium-derived hyperpolarizing factor as a reserve defense mechanism of the vascular control under ionizing radiation impact // International journal of physiology and pathophysiology. – 2012. – № 3(2). – P.161-173.
12. Кислова О.В. Особливості стимульованого та базального виділення нітрит-аніону після опромінення // Збірник наук. праць співроб. НМАПО ім. П.Л.Шупика. – К.: – 2006. – Вип.15. – Книга 2. – С. 658-663.

Стаття надійшла до редакції / Article received: 29.08.2013

Преимущества использования электродов Кларк-типа для определения концентрации азота(II) оксида и содержания его стабильных метаболитов - нитрит- и нитрат-анионов в биологических образцах.

Кислова О.В.

Киевский национальный университет технологий и дизайна

Статья характеризует основные методы прямого определения концентрации регулятора биологических процессов азота(II) оксида и его стабильных метаболитов - нитрит-и нитрат-анионов как маркеров функционирования NO-синтазной системы. Показаны преимущества определения этих показателей электрохимическим методом с использованием электродов Кларк-типа.

Ключевые слова: нитроген(II) оксид, нитрит- и нитрат-анионы, электроды Кларк-типа.

Advantages of Clark-type electrode using for determination the Nitrogen(II) oxide concentration and its stable metabolites - nitrite and nitrate anions - content in biological samples.

Kislova O.

Kyiv National University of Technologies and Design

This article describes the basic methods for the determination the concentration of biological active compound Nitrogen(II) oxide and its stable metabolites - nitrite- and nitrate anions functioning as markers of NO-synthase system. The advantages of electrochemical method determination their concentrations with a Clark-type electrode is shown.

Keywords: Nitrogen(II) oxide, nitrite- and nitrate anions, Clark-type electrodes.