

УДК: 612.82+612.127.4+591.88

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ УРОВНЯ МЕТАБОЛИТОВ МОНООКСИДА АЗОТА В ПЛАЗМЕ КРОВИ И ТКАНИ МОЗГА БЕЛЫХ КРЫС

Мажитова М.В.

ГОУ ВПО Астраханский государственный университет, Астрахань, Россия,
e-mail: marinamazhitova@yandex.ru

Исследована возможность спектрофотометрического определения уровня метаболитов NO в плазме крови и ткани мозга белых крыс. Определен уровень NO-метаболитов в плазме крови и разных отделах центральной нервной системы животных разного пола двух возрастных групп. Полученные результаты свидетельствуют о половых и возрастных особенностях уровня NO-метаболитов в плазме крови и ткани мозга лабораторных животных. Наиболее ярко половые различия выражены у молодых животных. С возрастом уровень NO-метаболитов у самцов и самок белых крыс изменяется неодинаково. Показано, что модифицированная методика с применением реактива Грисса с одновременным восстановлением нитратов до нитритов хлоридом ванадия (III) дает воспроизводимые результаты не только при исследовании сыворотки крови, но и плазмы крови, а также ткани мозга.

Ключевые слова: NO-метаболиты, спектрофотометрия, плазма крови, мозг.

SPECTROPHOTOMETRIC DEFINITION OF NO-METABOLITES LEVEL IN BLOOD PLASMA AND THE BRAIN FABRIC OF WHITE RATS

Mazhitova M.V.

Astrakhan state university, Astrakhan, Russia, e-mail: marinamazhitova@yandex.ru

The possibility of spectrophotometric definitions of metabolites NO level in blood plasma and brain tissue of white rats was investigated. The level of NO-metabolites in blood plasma and different departments of the central nervous system of animals of different sex and age groups was defined. Received results gave us the information about sexual and age special features of level NO - metabolites in blood plasma and brain tissue of laboratory animals. The most intelligibly sexual distinctions are expressed at young animals. With the years level of NO-metabolites at males and females of white rats changes unequally. It is shown that the modified technique with application of Griss- reactant with simultaneous reduction of nitrates to nitrites by vanadium (III) chloride yields reproduced results not only at research of blood whey, but also blood plasma, and also brain tissue.

Оксид азота NO рассматривается как устойчивый свободный радикал. NO – эндотермическое соединение со стандартной теплотой образования $\Delta H^{\circ}_{298} = 90,4$ кДж/моль. Стандартный изобарный потенциал образования ΔG°_{298} также имеет положительное значение (90 кДж/моль). Молекула NO парамагнитна. Согласно методу молекулярных орбиталей, в NO один из электронов находится

на $\pi_p^{\text{разр}}$ – орбитали: $(\sigma_s^{\text{св}})^2 (\sigma_s^{\text{разр}})^2 (\pi_p^{\text{св}})^4 (\sigma_x^{\text{св}})^2 (\pi_p^{\text{разр}})^1$, т.е. порядок связи в NO составляет 2,5 [1]. Будучи липофильным соединением не имеющим заряда, NO легко диффундирует в биологических средах и является достаточно долгоживущим: среднее время жизни в биологических тканях 5,6 с [3]. NO имеет огромное физиологическое значение, однако его молекула может реагировать с другими свободными радикалами. Энергия ионизации NO составляет 9,3 эв, следовательно молекула NO может терять непарный электрон с $\pi_p^{\text{разр}}$ – орбитали, образуя нитрозил (нитрозоний) – ион NO^+ . Также NO может выступать как окислитель и присоединять электрон с образованием неустойчивого аниона NO^- . Учитывая возможность окислительно-восстановительных реакций с участием молекулы NO и ее производных, при неблагоприятных условиях метаболизма может возникнуть нитрозилирующий стресс. Поэтому контроль за уровнем NO-метаболитов является актуальной задачей биохимии. Ранее В. А. Метельской, Н.Г. Гумановой (2005) [4] была описана методика определения уровня NO-метаболитов в сыворотке крови с применением прибора «Labsystems Vultiskan MCC/340» по принципу вертикального фотометрирования. Определенно, наличие такого оборудования облегчает и ускоряет проведение анализа, однако очень часто лаборатории оснащены другими, менее современными приборами, что диктует поиск модифицированных методик определения NO-метаболитов в разных тканях.

Вышесказанное определило **цель** нашей работы – исследовать возможность спектрофотометрического определения уровня NO-метаболитов в плазме крови и ткани мозга белых крыс разного пола и возраста с применением спектрофотометра марки ПЭ 5400В или его аналогов.

Материалы и методы. Для достижения поставленных целей нами был использован спектрофотометрический метод определения нитрит-иона [4], основанный на реакции нитритов с реактивов Грисса, который представляет собой смесь равных объёмов водного раствора 0,05 % N-нафтилэтилендиамина и 1 % раствора сульфаниламида в уксусной кислоте. Данный метод количественного определения нитрит-ионов основан на способности

первичных ароматических аминов в присутствии азотистой кислоты образовывать интенсивно окрашенные диазосоединения.

Максимум полосы поглощения образующегося соединения лежит при λ 540 нм. Поскольку реактив Грисса, с помощью которого проводятся определения, позволяет детектировать только нитрит-ион, необходимым условием анализа является перевод нитрата в нитриты, что достигается взаимодействием нитрат-ионов с хлоридом ванадия (III). Одновременно в реакционной среде протекает реакция диазотирования сульфаниламида образовавшимся нитритом с последующим развитием розовой окраски, интенсивность которой определяется спектрофотометрически. Учитывая, что хлорид ванадия (III) – лёгкий, летучий порошок, моментально окисляющийся в кислороде воздуха, склянку с ним хранили в эксикаторе в атмосфере азота. Все операции при приготовлении раствора хлорида ванадия (III) проводили за максимально короткое время в вытяжном шкафу. Для предотвращения гидролиза раствор хлорида ванадия (III) готовили на 1н соляной кислоте. В кислой среде в присутствии избытка хлоридных ионов образуются комплексы $[VCl_4(H_2O)_2]^-$ и их производные [1].

Для построения калибровочной кривой использовали 1М водный раствор $NaNO_2$. Перед употреблением его разводили в 1000 раз и готовили серию разведений для построения градуировочного графика. Так как по предварительно полученным данным линейность кривой сохраняется в диапазоне концентрации нитрит-иона от 5 до 100 мкМ, из 10^{-3} М раствора $NaNO_2$ получали растворы с концентрациями 5; 10; 20; 30; 50; 60; 70; 80; 90; 100 мкМ. Готовили серию из 10 пробирок, содержащих по 0,7 мл растворов $NaNO_2$ с соответствующими концентрациями. Далее добавляли по 0,7 мл свежее приготовленного раствора хлорида ванадия и по 0,7 мл реактива Грисса. Соблюдая указанные условия в методике, пробирки помещали на 30 минут в водяную баню при температуре 37°C. Каждый раствор серии готовили в 5 повторах. Измеряли оптическую плотность на спектрофотометре марки ПЭ 4000В в кюветах с расстоянием между светопропускающими гранями 0,5 см

при длине волны 540 нм. По полученным оптическим плотностям и известным концентрациям строили калибровочный график.

По методу наименьших квадратов было рассчитано уравнение калибровочного графика [2].

Оно имеет вид: $y_i = 0,021 + 0,00228x$

Для решения вопроса о возможности применения методики спектрофотометрического определения уровня NO-метаболитов в разных биологических объектах использовали плазму крови и ткань головного и спинного мозга самцов белых крыс. Беспородные белые лабораторные крысы-самцы (40 животных) содержались в стандартных условиях вивария. Содержание крыс в виварии и проведение экспериментов соответствовали «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных», разработанным и утвержденным МЗ СССР (1977 г.), а также принципам Хельсинкской декларации (2000 г.). Декапитацию животных производили после наркотизации этаминалом натрия (внутрибрюшинно в дозе 5 мг на 100 г массы тела). После декапитации собирали кровь в пробирки, обработанные гепарином, центрифугировали и отбирали плазму для анализов. Весь биологический материал (головной и спинной мозг) подвергали быстрой заморозке при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ в морозильной камере промышленного образца. Гомогенаты мозга готовили на фосфатном буферном растворе (рН 7,45) на холоде в кратчайшие сроки непосредственно перед исследованиями.

Определение нитрит ионов проводили после депротеинизации: к 1 мл плазмы крови добавляли двукратный избыток 96° этилового спирта, образовавшийся осадок денатурата отделяли центрифугированием при 3000 оборотов в минуту в течение 20 минут. Все последующие операции проводили аналогично, как и при получении растворов для градуировочного графика, соблюдая те же объемы реагентов, последовательность операций, временной и температурный режимы. Оптическую плотность раствора определяли при 540 нм. Количество нитрит-иона рассчитывали в мкмольях по калибровочной кривой. Таким способом определяли содержание суммарных метаболитов NO.

Для измерения концентрации нитрита депротенинизированную плазму крови инкубировали с реактивом Грисса без добавления VCl_3 , а концентрацию нитратов рассчитывали, вычитая из уровня суммарных метаболитов концентрацию нитритов.

Приведенная методика была откорректирована для проведения анализа ткани мозга на содержание метаболитов монооксида азота. Гомогенаты центрифугировали с целью отделения твердых включений, затем проводили депротенинизацию добавлением двукратного избытка по объему 96° этанола. Образовавшийся осадок денатурата отделяли центрифугированием при 3000 оборотов в минуту, однако в отличие от плазмы крови эту операцию проводили не менее 45 минут. В некоторых случаях требовалось повторное центрифугирование, т. к. осадок при депротенинизации ткани мозга получался менее плотный и менее тяжелый, чем при анализе плазмы крови. Все остальные операции аналогичны описанным выше.

Результаты.

По указанной выше методике определяли содержание суммарных метаболитов NO в плазме крови и разных отделах ЦНС: большие полушария, промежуточный, средний мозг, мозжечок, продолговатый и спинной мозг. Эксперименты проводили на самцах и самках двух возрастных групп (6 и 24 месяца). Полученные результаты представлены в табл. и свидетельствуют о более высоком уровне NO-метаболитов в исследованных объектах самок, по сравнению с самцами одной возрастной группы.

Таблица
Уровень метаболитов монооксида азота в плазме крови и ткани мозга

	Концентрация суммарных метаболитов NO, мкМ, (M±m)			
	Молодые (6 месяцев)		Старые (24 месяца)	
	самцы	самки	самцы	самки
Плазма крови	30,28±1,83	78,35±5,103#	67,24±3,362Δ	54,14±1,998#Δ
Большие полушария	19,1±0,573	38,4±1,536 #	20,51±1,026	40,15±1,606#
Промежуточный мозг	15,7±0,65	33,10±1,19 #	28,14±1,182Δ	27,73±0,971 Δ
Средний мозг	18,5±0,777	51,2±1,792 #	22,17±1,058Δ	48,49±1,455#

Мозжечок	28,6±1,144	46,8±1,217 #	31,58±1,579	40,11±1,203#Δ
Продолговатый мозг	27,11±1,084	62,38±2,807#	38,71±1,936Δ	51,17±2,047#Δ
Спинной мозг	28,4±1,42	29,5±1,003	30,58±1,233	32,79±1,180

- достоверно по сравнению с самцами того же возраста; Δ - достоверно по сравнению с группой молодых животных.

Наиболее ярко половые различия выражены у молодых животных. С возрастом в результате разнонаправленного изменения уровня NO-метаболитов у крыс разного пола различия между самцами и самками уменьшаются. В спинном мозге у животных всех групп уровень монооксида азота примерно одинаков. Вероятно, это связано с тем, что спинной мозг является наиболее филогенетически древним отделом ЦНС.

Полученные результаты лежат в биологически допустимом диапазоне и согласуются с данными других авторов [4, 5], что позволяет применять описанную методику для определения уровня NO в различных биологических объектах.

Выводы. На основании полученных результатов показано, что модифицированная методика спектрофотометрического определения уровня NO-метаболитов позволяет получить воспроизводимые результаты не только в сыворотке [4], но и в плазме крови, а также в гомогенатах из ткани мозга. При условии достаточного количества биологического материала измерение оптической плотности полученных растворов возможно на спектрофотометрах марки ПЭ 4000В или его аналогов. Полученные результаты свидетельствуют о половых и возрастных особенностях уровня NO-метаболитов в плазме крови и ткани мозга.

Литература

1. Ахметов, Н.С. Общая и неорганическая химия: учебник для ВУЗов. – М., 2001.
2. Булатов, М.И. Практическое руководство по фотоколориметрическим и спектрофотометрическим методам анализа [Текст] / М.И. Булатов, И.П. Калинин. – Л.: Химия, 1976. – 250 с.
3. Меньщикова, Е. Б. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты / Е. Б. Меньщикова, В. З. Ланкин, Н. К. Зенков, И. А. Бондарь, Н. Ф. Круговых, В. А. Труфакин. – М.: Фирма «Слово», 2006. – 556 с.

4. Метельская, В. А. Скрининг-метод определения уровня метаболитов оксида азота в сыворотке [Текст] / В. А. Метельская, Н.Г. Гуманова // Клиническая лабораторная диагностика. – 2005. – № 6. – С. 15–18.
5. Семячкина-Глушковская, О. В. Роль половых гормонов в регуляции базальной и стрессорной секреции оксида азота у крыс / О. В. Семячкина-Глушковская, Т. Г. Анищенко, Т. А. Синдякова, В. А. Бердникова, О. П. Епифанова // Астрах. мед. журнал. Т.3. - № 3. – 2008. – С.130–133.

Рецензенты:

Тризно Н.Н., д.м.н., профессор, зав. кафедрой патологической физиологии Государственного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Астраханская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, г. Астрахань.

Фельдман Б.В., д.б.н., зав. кафедрой биологии с курсом ботаники Государственного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Астраханская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, г. Астрахань.

Работа получена 27.07.2011.