Биомедицинская химия, 2003, том 49 №6, с.597-603

КЛИНИЧЕСКАЯ БИОХИМИЯ
МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ И СТАНДАРТИЗАЦИИ

УДК. 577.152.6.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОКСИДА АЗОТА В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА. МЕТОД ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ.

А.Г.Кобылянский[1], Т.В.Кузнецова[1], Г.Н.Соболева[1], О.Н.Бондаренко[2], О.А.Погорелова[1], В.Н.Титов[1], В.П.Масенко[1].

[1]Российский кардиологический научно-производственный комплекс Миздрава России, 121552, Москва, 3-я Черепковская ул., д. 15-а; факс: 414-61-35
[2]Росиийский научный эндокринологический центр РАМН, Москва Россия, 117036, Дмитрия Ульянова ул., д. 11.

Целью исследования является сравнение двух методов измерения нитритов и нитратов в сыворотке и плазме крови человека - колориметрического метода, основанного на реакции Грисса и метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЖХ).

Методом ВЖХ в группах здоровых доноров, больных диабетом и гипертонией показано, что в образцах сыворотки и плазмы крови уровень нитритов практически одинаков, чрезвычайно низок и в среднем составляет 3 мкмоль/л и менее. Уровень нитратов в группе здоровых доноров составляет 29,9±2,8 мкмоль/л, у больных сахарным диабетом этот уровень равен 58,6±6,9 мкмоль/л, а у пациентов, страдающих гипертонической болезнью, концентрация нитрата достигает 35,4±2,5 мкмоль/л. Обнаружены достоверные различия между уровнем этих ионов в крови донорской группы и больных диабетом ($p<0{,}0005$), а также между уровнем нитрата в группе больных гипертонией и донорами ($p<0{,}001$), отличий между этими показателями у гипертоников и доноров нет.

Сравнение двух методов: колориметрического и ВЖХ показало, что данные об уровне нитрата в одной и той же группе больных, полученные разными способами, достоверно ($p<0{,}001$) между собой коррелируют ($r=0{,}77$).

Обсуждаются методические особенности подготовки образцов сыворотки и плазмы крови для проведения и интерпретации результатов анализа с учетом биохимических свойств молекулы оксида азота.

Ключевые слова: оксид азота, плазма и сыворотка, определение, ВЖХ

ВВЕДЕНИЕ. В настоящее время проблема эндогенных оксида азота (ОА) и нитросоединений привлекает внимание биологов и медиков различных специальностей. Анализ данных литературы 80-90 годов свидетельствует о том, что исследования, посвященные изучению медико-биологических свойств ОА, охватывают беспрецедентно широкую область на стыке биохимии, молекулярной биологии, физиологии, клеточной биологии, фармакологии и токсикологии. Осуществление таких работ требует наличия достаточно простых и надёжных методов определения ОА в биологических объектах, молекула которого представляет собой неорганический газообразный свободный радикал со временем полужизни в несколько секунд. Существует несколько способов определения ОА, основанных на различных физико-химических свойствах ОА [1,2]. На наш взгляд, интересными и достойными внимания являются методы, основанные на измерении стабильных конечных продуктов окисления ОА, нитрита и нитрата, которые, в частности, образуются в биологических жидкостях (сыворотке и плазме крови).

В медико-биологических исследованиях наиболее часто используются колориметрические методы измерения нитратов и нитритов, основанные на реакции Грисса, и метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЖХ).

Целью нашего исследования являлось сравнение этих двух методик и определение адекватности применения метода ВЖХ в практике научно-медицинских и лабораторных исследований.

МЕТОДИКА. В своей работе мы использовали плазму и сыворотку крови группы здоровых доноров (20 человек), больных сахарным диабетом (36 человек), больных мягкой и умеренной формой гипертонии (47 человек) и больных семейной гиперхолестеринемией (16 человек). Образцы сыворотки и плазмы крови готовили стандартно. После забора кровь сразу центрифугировали, отделяя сыворотку и плазму. Пробы хранили при -70° С до анализа. В день анализа образцы размораживали, энергично встряхивали с помощью встряхивателя Vortex в течение 10 сек. Выпавшие в осадок белки удаляли центрифугированием (10000g, 15 мин). Супернатант отбирали и готовили для дальнейшей работы.

Определение нитритов и нитратов, как продуктов метаболизма оксида азота, осуществляли колориметрическим методом, в основе которого лежит реакция Грисса, используя для этого коммерческий набор фирмы "R&D" (США), и методом высокоэффективной жидкостной хроматографии [3]. Для проведения ВЖХ применяли высокоочищенные реактивы (analytical grade) и воду, очищенную MilliQ-MilliRO ("Millipore", США). Образец плазмы или сыворотки разводился эквивалентным количеством буфера, содержащим 5 мМ K_2HPO_4, 25 мМ KH_2PO_4 pH 3,5, белки отделяли фильтрованием через фильтр UltrafreeR-MC 10,000 NMWL Filter Units ("Sigma" США) при центрифугировании в течение 15 мин при 5000 об/мин. 20 мкл ультрафильтрата были анализированы в хроматографе ВЖХ ("Shimadzu" Япония) на колонке Multospher SAX-5 мкм в качестве элюирующего раствора использовали буфер, содержащий 5мМ K_2HPO_4, 25 мМ KH_2PO_4 pH 3,5. Количественную оценку нитритов и нитратов проводили, сравнивая результаты анализа проб с внешними стандартами при 214 нм.

Статистическую обработку данных проводили, используя критерий Манна-Уитни и корреляционный анализ Пирсона.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Перед использованием ВЖХ, как метода в лабораторной практике, мы выяснили его основные характеристики - чувствительность, "линейность" и "открытие". Эти параметры определялись на примере стандартов нитрита и нитрата в качестве которых использовали водные растворы KNO_2 и KNO_3. Диапазоны концентраций калибровочных кривых нитрита и нитрата составляли 1,5 - 100 мкмоль/л и 3,062 - 200 мкмоль/л, соответственно. Как видно из рисунка 1, линейность наблюдается на всём протяжении исследованного интервала концентраций. Минимальная концентрация, которую удалось достоверно определить, равна 0,5 мкмоль/л. Расчётная величина "открытия" использованного нами метода равна 91%.

При исследовании методом ВЖХ группы здоровых доноров, больных диабетом и гипертонией мы обнаружили, что в образцах сыворотки и плазмы крови уровень нитритов практически одинаков, чрезвычайно низок и в среднем

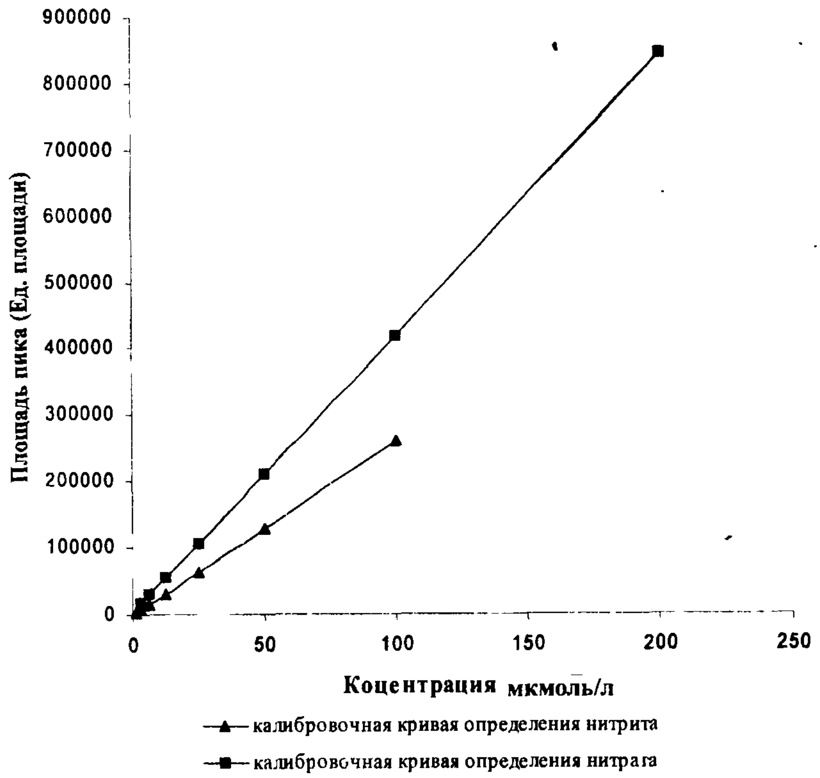

Рисунок 1.

Калибровочные кривые определения нитрита и нитрата в сыворотке и плазме крови человека

составляет 3 мкмоль/л и менее (данные не приведены). Уровень нитратов в группе здоровых доноров составляет 29,9 ± 2,8 мкмоль/л, у больных сахарным диабетом этот уровень равен 58,6 ± 6,9 мкмоль/л, а у пациентов, страдающих гипертонической болезнью, концентрация нитрата достигает 35,4 ± 2,5 [1] мкмоль/л (рис. 2). Причём, обнаружены достоверные различия между уровнем этих ионов в крови донорской группы и больных диабетом ($p<0,0005$), а также между уровнем нитрата в группе больных гипертонией и донорами ($p<0,001$), отличий между этими показателями у гипертоников и доноров нет. В ходе специальных исследований мы испытывали действия статина аторвастатина на функции эндотелия у больных семейной гиперхолестеринемией; частью этой работы было изучение его влияния на уровень нитритов и нитратов. Мы показали достоверное снижение уровня нитрата на фоне терапии аторвастатином с 53,4±5,1 до 35,5±5,1 мкмоль/л ($p<0,02$) [2].

В отдельном эксперименте мы провели сравнение двух методов: колориметрического и ВЖХ, измерив нитрат в крови одной и той же группы больных гипертонией тем и другим методом. Оказалось, что данные, полученные разными способами, достоверно ($p<0,001$) между собой коррелируют ($r=0,77$).

Успех количественного определения ОА через измерение конечных продуктов его обмена в пробах сыворотки и плазмы крови связан с соблюдением целого ряда условий в подготовке биологического материала и методических тонкостей, учитывающих биохимические свойства этой молекулы. При проведении собственно анализа необходимо учитывать, что всегда есть возможность привнесения нитратов и нитритов из пищи, воды и воздуха [6,5]; эти анионы также присутствуют во всей лабораторной посуде и реактивах [4,7]. Следовательно, чем сложнее обработка образца, тем больше возможностей внести примеси. Важно быстро, менее чем за 30 мин отделить плазму или сыворотку [8].

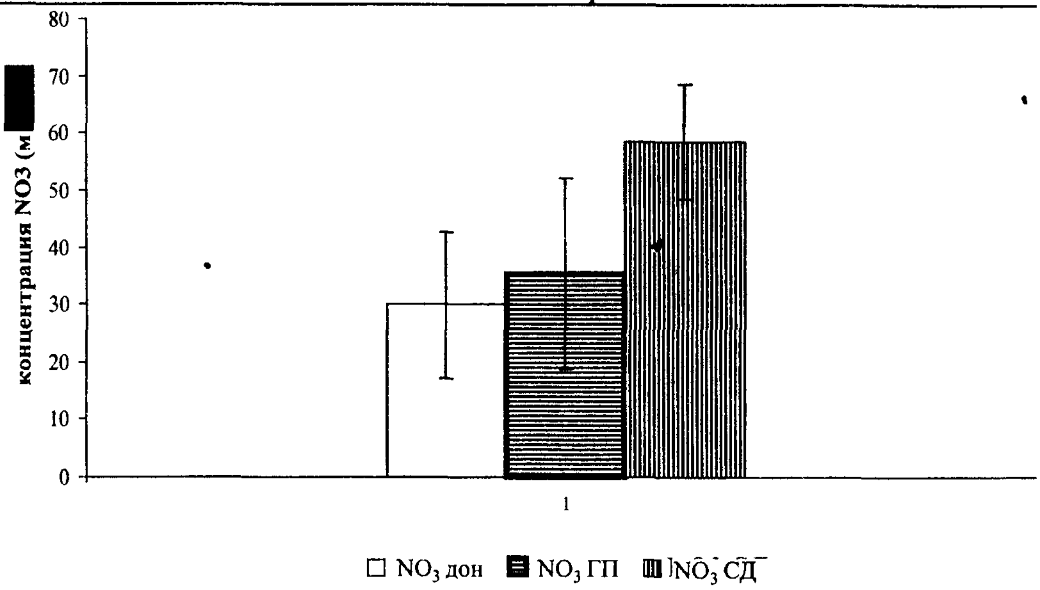

Рисунок 2.
Уровень нитратов в группах здоровых доноров (дон) и больных сахарным диабетом (СД) и гипертонией (ГП

При получении плазмы желательно использовать гепарин, т.к. использование ЭДТА в случае дальнейшего проведения реакции Грисса, в ходе которой предполагается восстановление нитрата в нитрит с помощью нитратредуктазы, может помешать действию фермента. Примесь цитрата натрия может привносить артефакты при анализе ВЖХ.

Ещё одной необходимой процедурой при подготовке проб является их депротеинизация. При использовании колориметрического метода она необходима для устранения артефактно высоких результатов, связанных с участием в реакции диазотирования, не только неорганических нитритов, но и других нитрозо-соединений (органических нитритов, нитрозаминов и др.), которые могут присутствовать в значительной части образцов сыворотки/плазмы [8-11]. В случае ВЖХ депротеинизация позволяет резко уменьшить количество разделяемых на колонке веществ с улучшением разрешения пиков нитритов и нитратов [4,13]. Чаще всего депротеинизацию проводят осаждением белков различными реактивами: сернокислым цинком [8], 0,6 Н перхлорной кислотой [12], ацетонитрилом, с последующим удалением осадка или фильтрованием пробы через гидроксиапатит [4]. Такие способы депротеинизации имеют свои недостатки, поскольку они трудоёмки и сопряжены с потерей эндогенного ОА и/или наоборот привнесением дополнительного количества нитритов и нитратов как примесей осаждающих реактивов, что может внести искажения в конечный результат.

В настоящее время наиболее удобным и воспроизводимым в рутинных анализах считается применение одноразовых микроцентрифужных фильтров, отделяющих соединения с молекулярной массой выше 5 или 10 кДа. Фильтры могут быть использованы практически с любыми последующими способами количественного определения нитритов и нитратов. Следует только помнить [3,6], что микроцентрифужные фильтры некоторых фирм содержат значительные и трудно удаляемые примеси нитрата (до 35 мкМ) [4,7], поэтому, их необходимо подбирать с минимальным загрязнением этими ионами. В фильтрах, которые мы использовали, примесь нитрата не превышала 2,5 мкМ.

Некоторыми методами, например, колориметрическим и флуориметрическим, об ОА судят по продукции нитрита. Для того чтобы учесть весь нитрит образца, необходимо нитрат восстановить до нитрита. Для этого используют ферментативный способ с примененнием нитратредуктазы [14] и химический с гидразин сульфатом [14,15] или хлоридом титана 111 [15]. По данным некоторых авторов [14], химическое восстановление уступает ферментативному в скорости, а также не дает стохиометрического превращения нитрата в нитрит. Кроме этих способов, используют восстановление нитрата активированным кадмием. Этот способ наименее удобен, т.к. его технология страдает чрезмерной чувствительностью к аминам и четвертичным аммониевым основаниям [12,15].

После того как удалось измерить в образце количество нитрита и нитрата, необходимо правильно интерпретировать полученные цифры. При этом необходимо учитывать целый ряд обстоятельств: 1) Нитрит в цельной крови очень быстро (95% в час) окисляется гемоглобином до нитрата. Поэтому обычно в исследуемых образцах сыворотки и плазмы нитрит или не обнаруживается вовсе, или же определяется в незначительных количествах (около 10% от конечной концентрации нитрита), которые никак не коррелируют с количественным изменением нитрата. Это, по-видимому, связано с большим интервалом времени между забором крови и получением образца плазмы или сыворотки. Поэтому для корректной оценки состояния ОА в исследуемых образцах достаточно знать концентрацию нитрата или сумму нитрата и нитрита (Nox), что и делается в большинстве работ [8]. 2) Надо иметь ввиду, что нитриты и нитраты стабильны в течение года в образцах, хранящихся при -20°C и ниже. 3) Время полужизни нитрата большое - 3,8 часа. При повторных стимулах оксида азота нитрат будет накапливаться не только в венозной крови, но и в артериальной. В таких условиях продукцию ОА целого организма или органа реально измеряет не нитрат отдельного образца венозной крови, а артериально-венозная разница нитрата [17]. При сердечной недостаточности, когда нарушена почечная функция, сравнение нитрата в венозной плазме у таких больных и у нормальных пациентов может отражать не увеличение продукции нитрата, а скорее изменение экскреции [6]. Некоторые другие авторы тоже оценивали артериально-венозную разницу Nox в отдельных органах. Такой подход обеспечивает более точную оценку продукции оксида азота в органе, чем измерение только венозного или артериального Nox, которые чувствительны к изменениям в объеме распределения или накопления нитрата [16].

Представляется интересным обсудить вопрос нормы для нитритов и нитратов в сыворотке/плазме крови человека. В литературе нет согласованных данных по этому вопросу. Сообщенные концентрации этих ионов у нормальных людей сильно варьируют от 20 мкмоль/л [6] до 97 мкмоль/л [5]. Значения для нитрита у здоровых доноров были 1,3-13 мкмоль/л (среднее значение 4,2 мкмоль/л, n=26) [8], 1,3 ± 0,15 мкмоль/л, (n=8) [13], 0,25-0,65 мкмоль/л (среднее 0,45 мкмоль/л, n=5) [7] и 0,54-4,4 мкмоль/л (n=10, наши данные). Некоторые авторы, получая данные по нитритам ниже 1 мкмоль/л, просто не учитывают их, считая, что при такой низкой концентрации вклад нитрита в продукцию оксида азота минимален [5]. Фактически диапазон сообщенных значений для нитрита очень большой (от 0,1 до 4,4 мкмоль/л даже по средним значениям) то есть отличие в 44 раза.

Значения нитрата у здоровых доноров были 4,0-45,3 мкмоль/л (среднее 19,7 мкмоль/л, n=26) [8], 34-46 мкмоль/л (среднее 41 мкмоль/л, n=8) [7], 26±2 мкмоль/л (n=8) [12], 20 мкмоль/л [6] и наши результаты - 14-45 мкмоль/л (среднее 29,9±2,8, n=20). Однако, Takahaghi и соавторы, проводя обследование офисных работников среднего возраста, получили значения для нитрата - 58 ± 5,41 мкмоль/л у женщин (n=79) и 97±9,38 мкмоль/л у мужчин (n=126). Авторы предположили наличие половых различий в концентрации этих ионов [6]. Таким образом, и в случае нитрата существует большой разброс значений в норме. Tanaka и соавторы [13] обратили внимание на то, что значения Nox (NO_2+NO_3) у здоровых доноров, помещенных в стационар, при наличии индивидуальных колебаний (20-40 мкмоль/л) в 6 часов утра имели сходный характер колебаний в течение суток (увеличивались к середине дня и возвращались к исходному уровню к 6 часам утра следующего дня). Кроме того, утренние значения Nox у таких доноров имели тенденцию снижаться при последующем взятии крови и стабилизировались в течение 4-х дней. Утренние уровни Nox у доноров, не помещенных в стационар, сильно варьировали изо дня в день. На основании этого авторы заключили, что для оценки базального уровня Nox кровь надо собирать в 6 часов утра по крайней мере еще 4 дня после первого отбора.

Возможным объяснением большого разброса значений концентраций нитритов и нитратов у здоровых доноров может служить наличие многих факторов, влияющих на эти показатели. При оценке результатов следует учитывать диету, которой придерживается исследуемый, применяемые лекарственные препараты, индивидуальные особенности клиренса, курение, стресс, а также особенности взятия крови. С другой стороны, нельзя упускать из вида возможные источники загрязнения образца сыворотки/плазмы нитратом на всех этапах подготовки и при проведении количественного анализа, которые могут искажать истинные значения концентраций этих ионов.

ЛИТЕРАТУРА.

1. *Соболева Г.Н., Балахонова Т.В., Рогоза А.Н., Кобылянский А.Г., Сергакова Л.М., Кузнецова Т.В., Масенко В.П., Атьков О.Ю., Карпов Ю.А.* (2000) Практикующий врач, №18, 40-42.
2. *Балахонова Т.В., Погорелова О.А., Сусеков А.В., Кобылянский А.Г., Кузнецова Т.В., Творогова М.Г., Масенко В.П., Титов В.Н., Кухарчук В.В., Атьков О.А.* (2002) Кардиология, **42**(1), 15-21
3. *Palmer R.M.J., Ferrige A.G., Moncada S.* (1987) Nature, **327**, 524-526.
4. *Kikuchi K., Nagano T., Hayakawa H., Hirata Y., Hirobe M.* (1993) J. Biol. Chem., **268**, 23106-231
5. *Everett S.A., Dennis M.F., Tozer G.M., Prise V.T., Wardman P., Stratford M.R.L.* (1995) J. Chromatogr. A, **706**, 437-442.
6. *Takahashi H., Nakanishi T., Nishimura M., Tanaka H., Yoshimura M.* (1992) J. Cardiovascular Pharmacology, **20** (Suppl. 12): S214-S216.
7. *Zeballos G.A., Bernstein R.D., Thompson C.I., Forfia P.R., Seyedi N., Shen W., Kaminski P.M., Wolin M.S., Hintze T.H.* (1995) Circulation, **91**, 2982-2988.
8. *Leone A.M., Francis P.L., Rhodes P., Moncada M.* (1994) Biochem. Biophys. Res. Commun., **200**, 951-957.
9. *Moshage H., Kok B., Huizenga J.R., Jansen P.L.M.* (1995) Clin. Chem., **41**, 892-896.
10. *Menyawi E., Looareesuwan S., Knapp S., Thalhammer F., Burgman H.* (1998) J. Chromatogr. B. Biomed Sci. Appl., **706**, 347-351.
11. *Tsikas D., Fuchs I., Gutzki F.M., Frolich V.C.* (1998) J. Chromatogr. B. Biomed Sci. Appl., **715**, 441-448.
12. *Archer S.* (1993) , FASEB J., **7**, 349-360.
13. *Tanaka S., Yashiro A., Nakashima Y., Nanri H., Ikeda M., Kuroiwa A.* (1997) Clin. Cardiol., **20**, 361-365.
14. *Wennmalm A., Benthin G., Edlund A., Jungerten L., Kieler-Jensen N., Lundin S., Westfelt U.N., Petersson A.S., Waagstein F.* (1993) Circ. Res., **73**, 1121-1127.
15. *Thayer J.R , Huffaker R.C.* (1980) Anal. Biochem., **102**, 110-119.
16. *Muscara M.N., Nucci G.* (1996) J. Chromatogr. B., 686, 157-164.
17. *Lewis T.V., Dart A.M., Chin-Dusting J.P.F., Kingwell B.A.* (1999) Arterioscler. Tromb. Vasc. Biol., **19**, 2782-2787.

Поступила 12.02.2002

IDENTIFICATION OF NITRIC OXIDE IN SERUM AND PLASMA OF BLOOD HUMAN. METOD OF HIGH PRESSURE LIQUID CHROMATOGRAPHY.

A.G.Kobyliansky[1]; T.V.Kuznethsova[1]; G.N.Soboleva[1]; O.N.Bondarenko[2]; O.A.Pogorelova[1]; V.N.Titov[1]; V.P.Masenko[1].

[1]Russian Cardiology Research Complex, 3-rd Cherepkovskaya st., 15 A, Moscow, 121552 Russia
[2]Russian Endocrinology Research Center, Dmitriy Uljanova st., 11, Moscow, 117036 Russia

Two methods of measurement of nitrite and nitrate determination in human serum and plasma (a colorimetric method based on Griess reaction and a HPLC method) have been compared

HPLC method revealed extremely low level of nitrites blood plasma, which was roughly the same (about 3 μM or less) in healthy donors, patients with diabetes and hypertension. The level of nitrates in the group of healthy donors (29.9 ± 2.8 μM) is lower than in patients with diabetes (58.6 ± 6.9 μM), and in patients with hypertension (35.4 ± 2.5 μM).

Comparison of data obtained by colorimetric and HPLC methods revealed close correlation ($r=0.77$, $p < 0,001$).

Methodical requirements for preparation of samples of serum and plasma of blood for analysis and correct intepretation of results are discussed in view of biochemical properties of nitric oxide molecule.

Key words: nitric oxide; plasma and serum; identification; HPLC.