

УДК 546.173/.175:612.014.464

©Смирнов, Таганович

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ УРОВНЯ $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ В КОНДЕНСАТЕ ВЫДЫХАЕМОГО ВОЗДУХА. ВОССТАНОВЛЕНИЕ НИТРАТОВ ЦИНКОМ

*А.С. Смирнов, А.Д. Таганович*

Кафедра биохимии Белорусского государственного медицинского университета,  
г. Минск, пр-кт Дзержинского, 83; тел.: +375-296-85-75-87;  
эл. почта: alexsmirnov@tut.by

Исследование конденсата выдыхаемого воздуха (КВВ) является новым перспективным методом диагностики воспалительного и окислительного статуса дыхательной системы. Оксид азота (NO) является одним из наиболее интересных и интенсивно изучаемых биомаркеров, который имеет короткий период полужизни и превращается в нитриты ( $\text{NO}_2^-$ ) и нитраты ( $\text{NO}_3^-$ ). В настоящей работе измерен уровень  $\text{NO}_2^-$  и общий уровень  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  в КВВ у курящих и некурящих людей. Для определения общего уровня  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  вначале  $\text{NO}_3^-$  восстанавливали цинком до  $\text{NO}_2^-$ , а затем общий уровень  $\text{NO}_2^-$  (восстановленный  $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ ) измеряли при помощи реакции Грисса. Средние концентрации  $\text{NO}_2^-$  в КВВ у некурящих и курящих составили соответственно  $2,9 \pm 0,22$  мкмоль/л против  $8,5 \pm 1,2$  мкмоль/л (среднее  $\pm$  станд. отклонение,  $p < 0,001$ ). Средний уровень общих нитритов  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  также был выше у курящих ( $5,65 \pm 0,68$  против  $14,6 \pm 1,43$ ;  $p < 0,001$ ). Коэффициент вариации составил 8%. Восстановление цинком  $\text{NO}_3^-$  из стандартных растворов с известной концентрацией составило  $93,4 \pm 9,6\%$ , а при добавлении определенного количества  $\text{NO}_3^-$  в КВВ -  $91,6 \pm 8,9\%$ . Метод восстановления нитратов цинком может использоваться для анализа  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  в КВВ.

**Ключевые слова:** конденсат выдыхаемого воздуха, нитраты, нитриты, цинк, реакция Грисса.

**ВВЕДЕНИЕ.** В последнее время большое внимание уделяется исследованию конденсата выдыхаемого воздуха (КВВ). На сегодняшний день становится очевидным, что состав КВВ отражает биохимические и воспалительные процессы в дыхательной системе [1]. Множество веществ – пероксид водорода ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), монооксид углерода (CO), эйкозаноиды, лактат, малоновый диальдегид - уже хорошо изучены в КВВ здоровых и больных людей. Наиболее интенсивно изучаемым биомаркером является оксид азота (NO) [2]. Повышенный уровень NO определяется при обострении бронхиальной астмы (БА) [3], у больных с бронхоэктатической болезнью [4] и курильщиков [5]. В то же время обнаружено, что концентрация NO не изменяется у людей, страдающих стабильными формами хронических обструктивных заболеваний легких (ХОЗЛ) [6]. Уровень NO понижен у больных с муковисцидозом [7].

Однако прямое измерение NO *in vivo* затруднено из-за его короткого периода полужизни: за несколько секунд оксид азота превращается в стабильные конечные продукты – нитриты ( $\text{NO}_2^-$ ) и нитраты ( $\text{NO}_3^-$ ).

Нитриты можно обнаружить в КВВ у здоровых и больных людей [8]. Высокие концентрации нитритов определяются у детей и взрослых с БА и ХОЗЛ [9]. Обнаружена взаимосвязь между уровнем нитритов в КВВ и дыхательным объемом у больных с острым респираторным дистресс-синдромом, находящихся на искусственной вентиляции легких [10].

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ В ВЫДЫХАЕМОМ ВОЗДУХЕ

Более полные сведения о количестве NO в дыхательной системе может предоставить совместное измерение нитритов и нитратов ( $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ ). В настоящее время в аналитической практике биохимических исследований для определения концентраций нитратов чаще применяются методы восстановления. Определение общего уровня  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  осуществляется в два этапа. Вначале  $\text{NO}_3^-$  восстанавливают до  $\text{NO}_2^-$ , а затем общий уровень  $\text{NO}_2^-$  (восстановленный  $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ ) может быть измерен при помощи колориметрической реакции Грисса [11] или флуориметрически, используя 2,3-диаминонафтаген [12].

Очень важно правильно выбрать восстановитель, поскольку процесс восстановления должен быть регулируемым и идти только до стадии образования нитритов. В настоящее время для превращения нитратов в нитриты при исследовании КВВ используют кадмий или ферментативное восстановление NADH-зависимой нитратредуктазой [13, 14]. Однако использование токсичного кадмия может представлять опасность для здоровья; кроме того было показано, что его восстанавливающая способность ингибируется в КВВ [13]. Метод ферментного восстановления является эффективным, но дорогим.

Целью нашего исследования явилось изучение возможности применения цинка в качестве восстановителя нитратов в КВВ для определения общего уровня  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  методом Грисса.

**МЕТОДИКА.** *Испытуемые.* Двадцать здоровых добровольцев были разделены на две группы: курящие (10 мужчин, средний возраст  $25,2 \pm 2,2$  года) и некурящие (10 мужчин, средний возраст  $24,4 \pm 2,1$  года). Стаж курения в группе курящих людей составил в среднем 4,2 года, по 10 сигарет в день. У всех испытуемых при предварительном осмотре была исключена респираторная патология. Обязательным условием у курящих было воздержание от курения не менее 1 ч до сбора у них конденсата выдыхаемого воздуха.

*Сбор КВВ.* Дыхательный конденсат получали с помощью специального устройства - конденсора, который представляет собой противоточный холодильник. Конденсор охлаждался с помощью тающего льда. Добровольцы дышали с обычной для них частотой дыхания (в среднем 18 вдохов/мин) и объемом выдоха на протяжении 15 мин. В некоторых случаях, при необходимости большого объема КВВ (5 мл) сбор продолжали до 40 мин. Собранный конденсат до исследования замораживали при  $-18^\circ\text{C}$ .

*Измерение  $\text{NO}_2^-$ .* Измерение концентрации  $\text{NO}_2^-$  проводили колориметрическим методом, используя реакцию Грисса - диазотирование сульфанидовой кислотой и 1-нафтиламином [15]. Стандартные растворы для построения калибровочной кривой (диапазон концентраций: 0,5 – 20 мкмоль/л) готовили из нитрита натрия ( $\text{NaNO}_2$ ), растворенного в деионизированной воде (сопротивление  $>18 \text{ M}\Omega/\text{cm}$ ). К 500 мкл стандартного раствора добавляли 500 мкл раствора реактива Грисса. Полученную смесь инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 15 минут. Светопоглощение измеряли спектрофотометром СФ-46 (ЛОМО, СССР) при длине волны 542 нм. В качестве контроля использовали 500 мкл деионизированной воды + 500 мкл реактива Грисса.

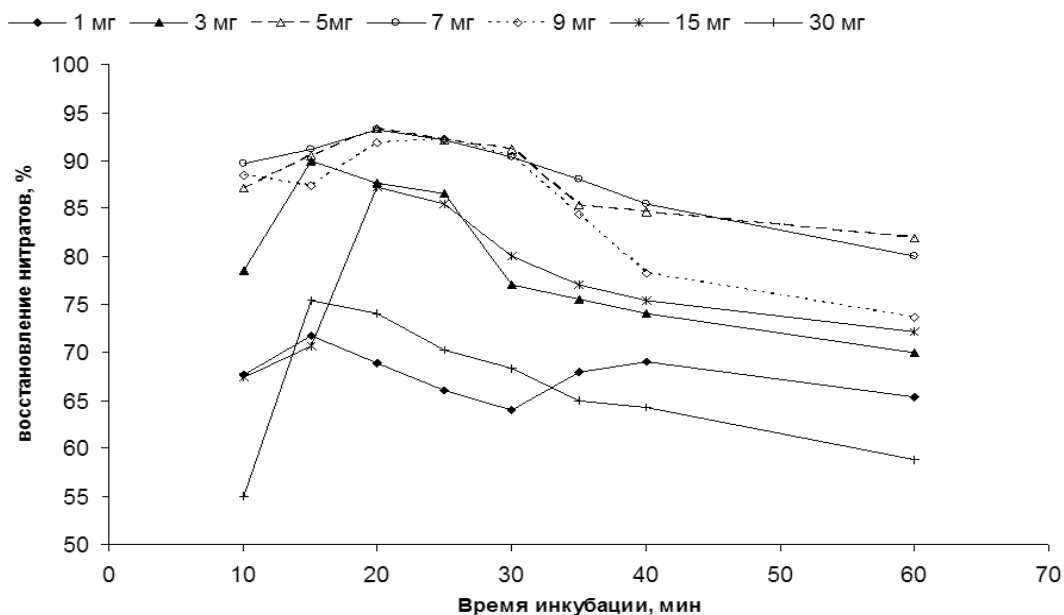
Концентрации нитритов в КВВ оценивали по стандартной кривой. Предел чувствительности метода составил 0,78 мкмоль/л (вычислен как среднее арифметическое контрольных проб ( $n=5$ ) плюс 2 стандартных отклонения). Стандартная кривая от 0,5 до 20 мкмоль/л показала выраженную линейную зависимость ( $R=0,99$ ;  $p<0,001$ ) между концентрацией нитритов в стандартах и светопоглощением.

*Приготовление цинка.* Меднение цинка проводили посредством активного перемешивания с 0,3 М раствором  $\text{CuSO}_4$  в течение 1 минуты. Избыток металлической меди удалялся тщательной промывкой деионизированной водой, после чего образовавшийся  $\text{Zn}(\text{OH})_2$  растворяли и вымывали 0,1 М  $\text{HCl}$ . Затем цинк высушивали на открытом воздухе.

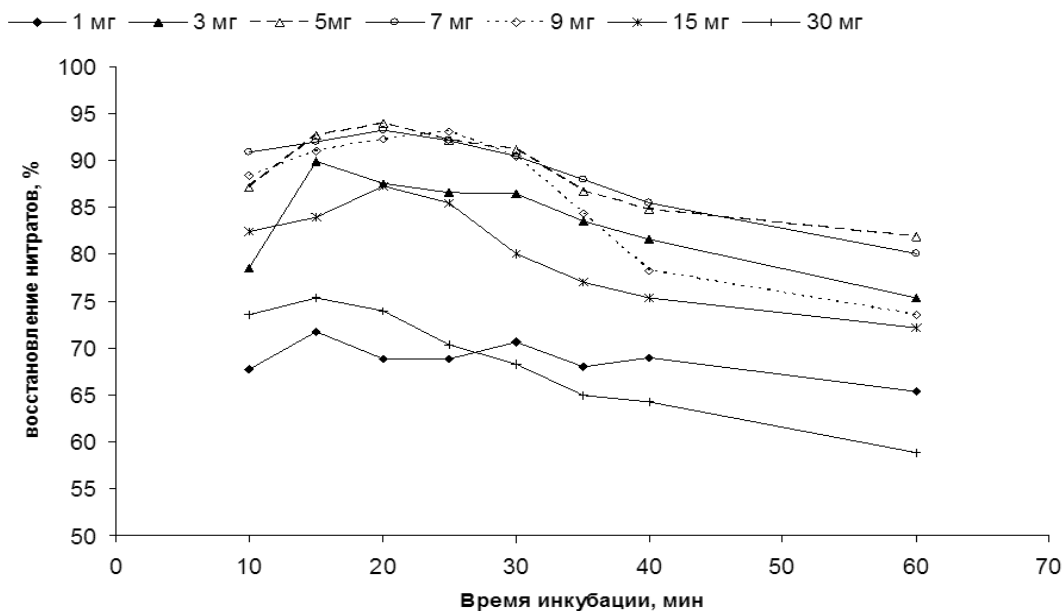
*Измерение  $\text{NO}_3^-$ .* Время, необходимое для восстановления нитритов в нитраты, а также концентрацию цинка выявляли экспериментально. Для этого к двум растворам нитрата натрия (2 мкмоль/л и 15 мкмоль/л) добавляли различное количество цинка (1, 2, 3, 5, 7, 9, 15, 30 мг/мл) и инкубировали в течение 20 мин, интенсивно перемешивая. Наибольший процент восстановления определялся при добавлении цинка в концентрации 5 мг/мл (рис. 1). Такое количество цинка затем использовали для выявления оптимального времени инкубации (10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 и 60 мин). Наибольший процент восстановления выявлен при инкубации в течение 20 мин.

**А**

Количество цинка, мг/мл раствора:

**Б**

Количество цинка, мг/мл раствора:

**Рисунок 1.**

Восстановление нитратов (% от первоначальной концентрации) в зависимости от количества цинка и времени инкубации. Начальная концентрация  $\text{NO}_3^-$  2 мкмоль/л (А). Начальная концентрация  $\text{NO}_3^-$  15 мкмоль/л (Б). Каждая точка на графике представляет среднее арифметическое двух экспериментов.

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ В ВЫДЫХАЕМОМ ВОЗДУХЕ

Для оценки степени восстановления нитратов в нитриты строили калибровочную кривую. Стандартные растворы (диапазон концентраций: 0,5–20 мкмоль/л) готовили из нитрата натрия ( $\text{NaNO}_3$ ), растворенного в деионизированной воде. К 500 мкл стандартного раствора добавляли 2,5 мг цинка, интенсивно перемешивали в течение 20 минут, а затем центрифугировали. К полученному супернатанту добавляли реактив Грисса и через 15 минут проводили спектрофотометрию.

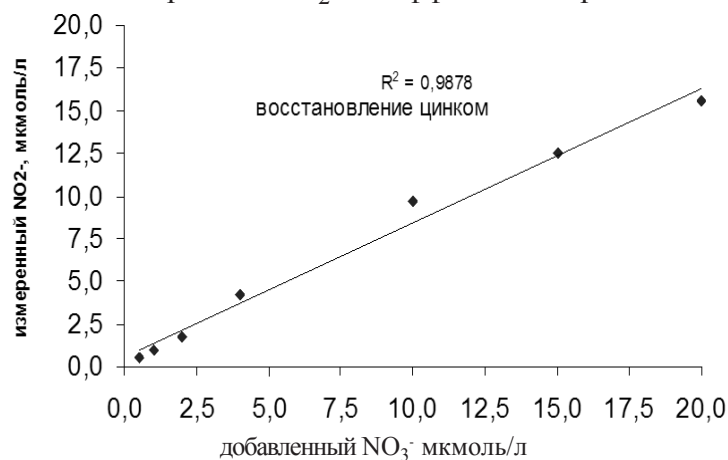
Помимо этого экспериментально оценивали вероятность восстановления нитратов не до нитритов, а до аммиака. Для этого к стандартным растворам нитрата натрия (от 0,5 до 20 мкмоль/л) после центрифугирования добавляли реактив Несслера и проводили спектрофотометрическое исследование полученного раствора при длине волны 700 нм. Во всех пробах аммиак обнаружен не был.

Восстановление нитратов в КВВ осуществляли аналогично методике восстановления стандартных растворов.

*Определение нитритов и нитратов, добавленных в КВВ.* КВВ образуется при конденсировании водного пара внешней среды, а также аэрозольной примеси, которая возникает при испарении жидкости, прилежащей к эпителиальной выстилке дыхательных путей. Капельки этой респираторной жидкости могут содержать многие вещества-восстановители – цистеин, глутатион, аскорбиновую кислоту, NADPH. Эти компоненты потенциально могут взаимодействовать с реактивом Грисса, изменяя тем самым показатели  $\text{NO}_2^-$  и  $\text{NO}_3^-$  [11]. Для определения такого влияния конденсат от одного пациента был разделен на четыре группы (в каждой группе по пять проб). В первой группе определяли эндогенный уровень нитритов по стандартной методике. Во второй к каждой пробе был добавлен  $\text{NaNO}_2$  в концентрации 7,5 мкмоль/л, а затем проведено определение общего уровня  $\text{NO}_2^-$  (эндогенного и экзогенного). Аналогичная процедура была повторена для нитратов – известное количество  $\text{NaNO}_3$  (7,5 мкмоль/л) было добавлено в КВВ (третья группа – эндогенный уровень и четвертая группа эндогенный + экзогенный).

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** *Определение  $\text{NO}_2^-$ .* Уровень  $\text{NO}_2^-$  в конденсате выдыхаемого воздуха у здоровых добровольцев был ниже ( $2,9 \pm 0,22$  мкмоль/л) по сравнению с курящими ( $8,5 \pm 1,2$  мкмоль/л,  $p < 0,001$ ). Результаты в пробах с добавленным стандартом  $\text{NaNO}_2$  показали, что извлечение предварительно внесенных нитритов составляет  $97,4 \pm 8,2\%$  от добавленного вещества (7,5 мкмоль/л).

*Восстановление стандартных растворов  $\text{NO}_3^-$ .* Эффективность восстановления нитратов цинком оценивали по количеству нитритов, определяемых в стандартных растворах  $\text{NaNO}_3$  реактивом Грисса после инкубации с цинком. Эффективность восстановления составила  $93,4 \pm 9,6\%$ . На рисунке 2 показана выраженная корреляция между изначальной концентрацией  $\text{NO}_3^-$  и измеренной концентрацией  $\text{NO}_2^-$ . Коэффициент вариации составил 8%.



**Рисунок 2.**

Корреляция между концентрациями стандартов  $\text{NO}_3^-$  и измеренным  $\text{NO}_2^-$  после восстановления цинком.

В случае восстановления цинком нитратов, добавленных в КВВ, образовавшиеся нитриты составляли  $91,6 \pm 8,9\%$  от первоначального уровня ( $7,5$  мкмоль/л).

*Определение  $\text{NO}_3^-$  в КВВ.* У здоровых некурящих людей общая концентрация  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  была ниже, чем у курящих ( $5,65 \pm 0,68$  против  $14,6 \pm 1,43$ ;  $p < 0,001$ ) (рис. 3).

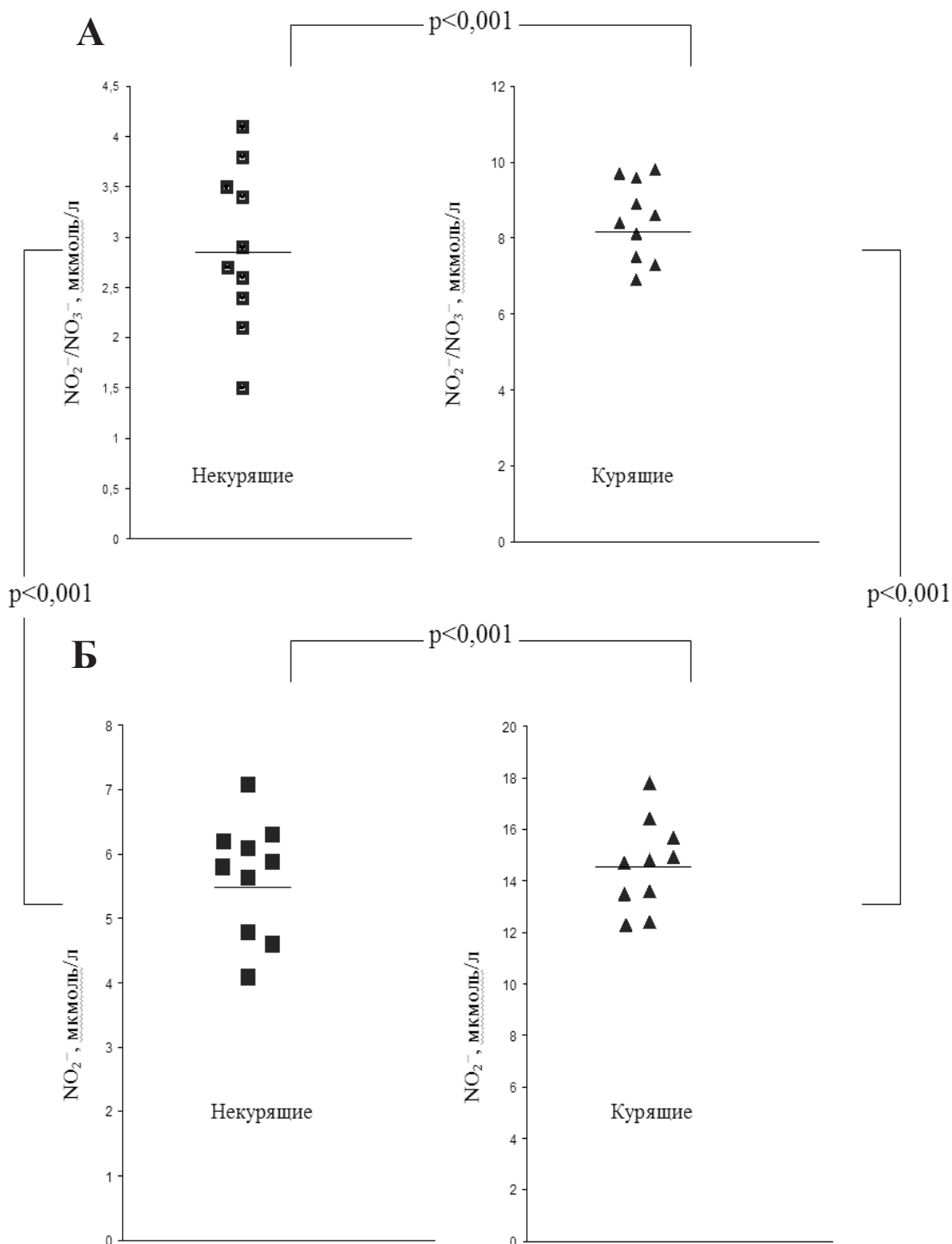


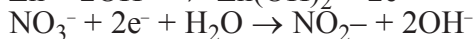
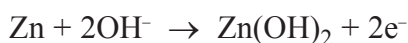
Рисунок 3.

Распределение значений  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  в изучаемых группах. **А)** Концентрация нитритов в КВВ у курящих и некурящих. **Б)** Общий уровень  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  в КВВ у курящих и некурящих измеренный после восстановления нитратов цинком. Все данные приведены как индивидуальные значения и средние,  $p < 0,001$ .

**ОБСУЖДЕНИЕ.** Концентрация NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> в КВВ изменяется в связи с различными состояниями и заболеваниями дыхательной системы [8, 9, 15-17], поэтому их измерение может иметь практическое значение.

Содержание нитритов в КВВ является достаточным для того, чтобы определять их реакцией Грисса. Наши результаты, а также данные, полученные в других лабораториях, подтверждают эффективность метода Грисса. Согласно некоторым исследованиям, медианный уровень нитритов у здоровых взрослых людей оценивается от 0,63±0,41 мкмоль/л [15] до 0,78±0,072 [18]. Эти значения ниже, чем полученные при использовании флуориметрического метода у некурящих (3,2±0,5 мкмоль/л) и курящих (2,4±0,3 мкмоль/л) [5]. В нашей работе уровень NO<sub>2</sub><sup>-</sup> у некурящих (2,9±0,22 мкмоль/л) был наиболее близок к результатам, полученным в другой лаборатории (1,8 ± 0,3 мкмоль/л) [19], а у курящих он был существенно выше (8,5± 1,2 мкмоль/л), чем обнаружено ранее [5].

Основной целью нашего исследования была оценка цинка в качестве восстановителя NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Предполагается, что этот метод основывается на серии реакций:



До настоящего времени в качестве основного неферментного метода восстановления и количественного определения нитратов применяли медь-кадмий-цинковый или медь-кадмиевый катализатор [13, 14, 20]. Главным недостатком этого метода считается высокая токсичность кадмия. Помимо этого было показано, что в КВВ нарушается процесс конверсии NO<sub>3</sub><sup>-</sup> → NO<sub>2</sub><sup>-</sup> при восстановлении кадмием; более того, при увеличении объема КВВ он ингибируется [13]. В нашем опыте также обнаружено влияние КВВ на восстанавливающую способность цинка (91,6±9% в КВВ и 93,4±9,6% в стандартных растворах). Однако это влияние не так значительно, как при использовании кадмия (20% от внесенного нитрат-иона).

Другим методом исследования нитратов является ферментативное восстановление NADH-зависимой нитратредуктазой [14, 21]:



Эта реакция останавливается избытком NADP<sup>+</sup>, поэтому его необходимо удалять из раствора:



Хотя метод является достаточно точным (восстановление NO<sub>3</sub><sup>-</sup> → NO<sub>2</sub><sup>-</sup> до 99%), его стоимость существенно превышает предлагаемый метод. Несмотря на то, что восстановление нитратов цинком в предлагаемом нами методе показало несколько меньшую эффективность (93,4±9,6%) по сравнению с ферментным, этот метод гораздо более доступен и дешевле.

В большинстве работ, посвященных изучению уровня NO-метаболитов в КВВ, опубликованы сведения только об уровне NO<sub>2</sub><sup>-</sup> [5, 8, 18, 19]. Лишь в единичных работах сообщается об измерении концентрации NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> [13, 15]. Предлагаемый простой и воспроизводимый метод определения нитратов будет способствовать более широкому использованию этого показателя в КВВ и, тем самым, более эффективной оценке маркеров метаболизма NO в норме и патологии.



## ЛІТЕРАТУРА

1. *Kharitonov S.A., Barnes P.J.* (2001) *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **163**, 1693–1722.
2. *Barnes P.J., Belvisi M.G.* (1993) *Thorax*, **48**, 1034–1043.
3. *Kharitonov S.A., Barnes P.J.* (2000) *Eur. Respir. J.*, **16**, 781–792.
4. *Kharitonov S.A., Wells A.U., O'Conner B.J., Cole P.J. et al.* (1995) *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **151**, 1889–1893.
5. *Balint B., Donnelly L.E., Hanazawa T., Kharitonov S.A., Barnes P.J.* (2001) *Thorax*, **56**, 456–461.
6. *Rutgers S.R., Van der Mark T.W., Coers W., et al.* (1999) *Thorax*, **54**, 576–580.
7. *Thomas S.R., Kharitonov S.A., Scott S.F., Hodson M.E., Barnes P.J.* (2000) *Chest*, **117**, 1085–1089.
8. *Ho L.P., Innes J.A., Greening A.P.* (1998) *Thorax*, **53**, 680–684.
9. *Corradi M., Montuschi P., Donnelly L.E., Pesci A., Kharitonov S.A., Barnes P.J.* (2001) *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **163**, 854–858.
10. *Ranieri V.M., Suter P.M., Tortorella C., De Tullio R., Dayer J.M., Brienza A., Bruno F., Slutsky A.S.* (1999) *JAMA*, **282**, 54–61.
11. *Titheradge M.E.* (1998) *Methods Mol. Biol.*, **100**, 83–91.
12. *Misko T.P., Schiling R.J., Salvemini D., Moore W.M., Currie M.G.* (1993) *Anal. Biochem.*, **214**, 11–15.
13. *Dziedzic B., Mazanowska-Gajdowicz J., Walczewska A., Sarniak A., Nowak D.* (2003) *Clin. Chim. Acta.*, **335**, 65–74.
14. *Green L.C., Wagner D.A., Glogowski J., Skipper P.L., Wishnok J.S., Tannenbaum S.R.* (1982) *Anal. Biochem.*, **126**, 131–138.
15. *Ganas K., Loukides S., Papatheodorou G., Panagou P., Kalogeropoulos N.* (2001) *Respir. Med.*, **95**, 649–654.
16. *Cunningham S., McColm J.R., Ho L.P., Greening A.P., Marshall T.G.* (2000) *Eur. Respir. J.*, **15**, 955–957.
17. *Formanek W., Inci D., Lauener R.P., Wildhaber J.H., Frey U., Hall G.L.* (2002) *Eur. Respir. J.*, **19**, 487–491.
18. *Hunt J., Byrns R.E., Ignarro L.J., Gaston B.* (1995) *Lancet*, **346**, 1235–1236.
19. *Nightingale J.A., Rogers D.F., Barnes P.J.* (1999) *Thorax*, **54**, 1061–1069.
20. *Rockett K.A., Awburn M.M., Aggarwal B.B., Cowden W.B., Clark I.A.* (1992) *Infect. Immun.*, **60**, 3725–3730.
21. *Wu G.Y., Brosnan J.T.* (1992) *Biochem. J.*, **281**, 45–48.

Поступила: 11. 01. 2005

**DETERMINATION OF NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> IN EXHALED BREATH CONDENSATE.  
ZINC-CATALYZED NITRATE REDUCTION**

*A.S. Smirnov, A.D. Tahanovich*

Department of Biochemistry, Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus;  
tel.: +375-296-85-75-87; e-mail: alexsmirnov@tut.by

Analysis of exhaled breath condensate (EBC) is a new prospective method for monitoring of inflammation and oxidative stress in lungs. The most extensively studied exhaled biomarker is nitric oxide (NO). It has very short life span and is converted into nitrites (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) and nitrates (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). In this study the level of NO<sub>2</sub><sup>-</sup> and total level of NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> have been measured in EBC of smokers and non-smokers. Prior determination of NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> the nitrates were reduced to nitrites with zinc, and total level of NO<sub>2</sub><sup>-</sup> was detected by Griess reaction. The mean concentrations of NO<sub>2</sub><sup>-</sup> in EBC of non-smokers and smokers were 2.9±0.22 μmol/l vs. 8.5±1.2 μmol/l (mean ± SD, p<0.001). The level of total nitrites NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> was also higher in smokers (5.65±0.68 vs. 14.6±1.43; p<0.001). Variability index was 8%. Recovery of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> from standard solutions was 93.4±9.6%, and 91.6±8.9% from EBC. We recommend zinc reduction as good and simple method for NO<sub>3</sub><sup>-</sup> determination in EBC.

**Key words:** exhaled breath condensate, nitrate, nitrite, zinc, Griess reaction.