= ПЛАЗМОХИМИЯ =

УДК 544.55

# ОБРАЗОВАНИЕ ПЕРОКСИНИТРИТА ПОД ДЕЙСТВИЕМ ИЗЛУЧЕНИЯ ПЛАЗМЫ ИСКРОВОГО РАЗРЯДА

© 2014 г. И. М. Пискарев\*, И. П. Иванова\*\*, С. В. Трофимова\*\*, А. А. Ичеткина\*\*, О. Е. Бурхина \*\*

\*Научно-исследовательский институт ядерной физики им. Д.В. Скобельцына МГУ им. М.В. Ломоносова 119991, Москва, Воробьевы горы

E-mail: i.m.piskarev@gmail.com

\*\*Нижегородская государственная медицинская академия Министерства здравоохранения и социального развития 603005, Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, 10/1

Поступила в редакцию 01.11.2013 г.

Изучено образование пероксинитрита (ONOO<sup>-</sup>) в воде под действием УФ-излучения плазмы искрового разряда на воздухе. Обрабатывались растворы с рН<sub>0</sub> 3.11–12.86. Во всех случаях сразу после обработки отмечается уменьшение рН, которое продолжается в течение 14 дней. Линия поглощения, характерная для пероксинитрита ( $\lambda = 302$  нм), появляется в спектре на 4–5 день после обработки и достигает максимума на 10-12 день. Появление пероксинитрита через несколько дней после обработки может быть обусловлено образованием в момент импульса излучения при высокой плот-

ности активных частиц вещества X, которое распадается по схеме  $X \rightarrow ONOO^- \rightarrow NO_3^-$  и имеет время жизни порядка 10 сут. Максимальный выход пероксинитрита равен  $(1.2 \pm 0.5) \times 10^{-2}$  моль/л. DOI: 10.7868/S0023119714030132

Роль азотных соединений в биологии установлена сравнительно недавно и в настоящее время этому вопросу уделяется большое внимание [1]. Открытие способности клеток млекопитающих синтезировать оксид азота, а также способность оксида азота ингибировать пролиферацию клеток и индуцировать апоптоз [2, 3] стимулировало научные исследования в биологии и медицине. Реакция NO<sup>•</sup> с супероксидом  $O_2^{-}$ , в результате которой образуется существенно более сильный окси-– пероксинитрит ОNOO<sup>-</sup>, является лант ключевым моментом роли NO<sup>•</sup> в физиологии и патологии [4]. В частности, пероксинитрит вызывает ковалентные перестройки в белковых молекулах клетки, повреждает ДНК и, как следствие, активирует апоптоз [5, 6]. Для исследований пероксинитрит получают реакцией  $NO_2^-$  с  $H_2O_2$  при рН 13 [7]. Возможны другие варианты [8]. Достижимо получение пероксинитрита концентрацией 0.1-1 моль/л.

В [9, 10] был разработан генератор излучения плазмы искрового разряда. В [11] построена кинетическая модель процессов в воде под действием излучения искрового разряда. Основные активные частицы, образующиеся под действием излучения в воде, – радикалы HO<sub>2</sub> и пероксинитрит ONOO-(пероксиазотистая кислота ONOOH). Пероксинитрит является высокоактивной частицей. В нейтральной и кислой среде его время жизни порядка 1.3 с, а в щелочной среде достигает нескольких суток, в отличие от радикалов, время жизни которых порядка 10<sup>-5</sup>-10<sup>-9</sup> с. Пероксинитрит распадается преимущественно с образованием ионов азотной кислоты NO<sub>3</sub>. За счет относительно большого времени жизни даже в нейтральной среде стационарная концентрация пероксинитрита оказывается самой большой среди всех продуктов, образующихся под действием излучения газоразрядной плазмы в воде, и составляет  $1.5 \times 10^{-6}$  моль/л [11].

Образование радикалов НО<sup>-</sup> под действием излучения газоразрядной плазмы было идентифицировано в [10]. Особенности реакций под действием радикалов НО; рассмотрены в [12] на примере перекисного окисления липидов. В работах, посвященных излучению газоразрядной плазмы, сам пероксинитрит непосредственно идентифицирован не был, определялось только накопление ионов азотной кислоты. Следует подчеркнуть, что, согласно модели процесса [11], описать экспериментально наблюдаемый выход азотной кислоты без учета пероксинитрита было невозможно.

Целью настоящей работы является идентификация пероксинитрита, образующегося при искровом разряде, экспериментальная оценка его концентрации и изучение свойств образующихся при импульсном электрическом разряде продуктов, содержащих пероксинитрит.

#### ПИСКАРЕВ и др.

рН <sub>0</sub> до обработки	3.11 ± 0.02	$5.9\pm0.02$	$11.5\pm0.01$	$11.9\pm0.01$	$12.11 \pm 0.01$	$12.86\pm0.01$
рН сразу после обработки	$2.76\pm0.02$	$2.92\pm0.02$	$3.2 \pm 0.02$	$10.29 \pm 0.01$	$11.57 \pm 0.01$	$12.85 \pm 0.01$
Выход ионов						
NO <sub>3</sub> за время обработки (моль/л)	$(1 \pm 0.3) \times 10^{-3}$	$(1.2 \pm 0.3) \times 10^{-3}$	$(3.8 \pm 1) \times 10^{-3}$	$(7.7 \pm 1.5) \times 10^{-3}$	$(9.1 \pm 2.5) \times 10^{-3}$	$(1.7 \pm 0.8) \times 10^{-3}$
рН через 14 сут после обработки	$2.65\pm0.02$	$2.73\pm0.02$	$3.02 \pm 0.02$	$7.35\pm0.02$	$9.5\pm0.01$	$12.83 \pm 0.01$
Выход ионов						
NO <sub>3</sub> за 14 сут после обработки (моль/л)	$(4.2 \pm 1) \times 10^{-4}$	$(6.6 \pm 1.5) \times 10^{-4}$	$(3\pm1)\times10^{-4}$	$(1.9 \pm 0.5) \times 10^{-4}$	$(3.6 \pm 1) \times 10^{-3}$	$(3.2 \pm 1) \times 10^{-3}$
Суммарный выход ионов NO <sub>3</sub> (моль/л)	$(1.4 \pm 0.3) \times 10^{-3}$	$(1.8 \pm 0.4) \times 10^{-3}$	$(4.1 \pm 1) \times 10^{-3}$	$(7.9 \pm 1.5) \times 10^{-3}$	$(1.2 \pm 0.5) \times 10^{-2}$	$(4.9 \pm 1.5) \times 10^{-3}$

Изменения pH растворов сразу после обработки и при хранении в течение 14 сут. Выход ионов NO<sub>3</sub>, соответствующий уменьшению pH

### МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В качестве источника излучения использовался генератор искрового разряда ИР-10 [9]. В нем используется излучение плазмы самостоятельного искрового разряда (ИР) на воздухе со следующими параметрами: расстояние между электродами 3 мм, зарядная емкость 3.3 нф, высокое напряжение 11 кВ, энергия в импульсе  $5.9 \times 10^{-2}$  Дж, частота повторения импульсов 10 Гц. Излучает нагретый импульсом тока плазменный шнур. Максимум сплошного спектра излучения 220 нм, поток фотонов на расстоянии 1 см от электродов  $1.26 \times 10^{-10}$  моль см<sup>-2</sup> с<sup>-1</sup>, плотность потока энергии ( $2 \pm 0.3$ )  $\times 10^{-3}$  Дж см<sup>-2</sup> с<sup>-1</sup> [13].

Обработка растворов излучением плазмы искрового разряда осуществлялась во фторопластовой чашке Петри диаметром 90 мм. Объем жидкости 20 мл. Время обработки 30 мин. Расстояние от поверхности жидкости до электродов 30 мм. Чашку Петри помещали в широкую стеклянную посуду объемом 0.5 л. Сверху емкость закрывали фторопластовой крышкой с отверстием диаметром 50 мм для ввода электродов генератора ИР-10. Кислую среду с pH<sub>0</sub> < 5.9 получали добавлением азотной кислоты, щелочную,  $pH_0 > 7$ , – NaOH. Измеряли рН и спектр поглощения в диапазоне длин волн 200-400 нм для исходного раствора и сразу после обработки. Далее для всех растворов наблюдали изменение рН и спектров поглощения в течение 14 сут. Использовались химически чистые реактивы, дистиллированная и дважды дистиллированная вода ( $pH_0$  5.9 и 6.5).

Измерения спектров проводили на спектрофотометре ФЛЮОРАТ-02 ПАНОРАМА (Люмэкс, Санкт-Петербург, Россия). Толщина кюветы 10 мм. Идентификация ионов кислотных остатков осуществлялась с помощью ионоселективных электродов [9]. Для калибровки электродов по ионам NO<sub>2</sub><sup>-</sup> и NO<sub>3</sub><sup>-</sup> использовались раствор NaNO<sub>2</sub> и азотная кислота. Эти же реактивы применялись для определения коэффициентов экстинкции максимумов в спектрах поглощения ионов NO<sub>2</sub><sup>-</sup> ( $\lambda$  = 355 нм) и NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ( $\lambda$  = 302 нм). Величину рН измеряли прибором Эксперт 001 (фирма "Эконикс", Россия).

# РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Значения pH растворов до и сразу после обработки излучением плазмы ИР в течение 30 мин и после выдержки при комнатной температуре в течение 14 сут представлены в таблице. Значения pH<sub>0</sub> исходных растворов были от 3.11 до 12.86. Сразу после обработки pH всех растворов уменьшается. Уменьшение pH может быть обусловлено образованием пероксинитрита и его последующим распадом на азотную кислоту: NO<sup>•</sup> + O<sub>2</sub><sup>-</sup>  $\rightarrow$  $\rightarrow$  ONOO<sup>-</sup>  $\rightarrow$  NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

ХИМИЯ ВЫСОКИХ ЭНЕРГИЙ том 48 № 3 2014

254

Образование пероксинитрита включено в систему реакций под действием УФ-излучения ИР [11]. Значения рН продолжают уменьшаться при выдержке в течение 14 сут. Выход ионов  $NO_3^-$ , соответствующий уменьшению рН, приведен в таблице. Накопление ионов  $NO_3^-$  было идентифицировано ионоселективным электродом. Концентрация ионов  $NO_2^-$ , оцененная ионоселективным электродом, не превышала  $10^{-4}$  моль/л. Из таблицы видно, что с увеличением начального значения  $pH_0$  от 3.11

до 12.11 выход  $NO_3^-$  растет. При максимальном значении  $pH_0$  12.86 уменьшение pH едва превышает ошибку измерений, хотя ошибка измерения pH при этом  $pH_0$ , равная 0.01 единицы pH, соответствует

выходу ионов  $Y(NO_3^-) = 1.7 \times 10^{-3}$  моль/л.

Протонированная форма пероксинитрита, пероксиазотистая кислота HOONO (pK<sub>a</sub> = 6.8) имеет период полураспада ~1.3 с [8]. Спектр поглощения пероксиазотистой кислоты характеризуется широким слабо выраженным максимумом при  $\lambda = 355-360$  нм ( $\epsilon = 100 \text{ моль}^{-1} \text{ см}^{-1}$ ) и монотонным увеличением оптической плотности с уменьшением длины волны. Пероксинитрит имеет максимум поглощения в УФ-спектре при  $\lambda = 302$  нм ( $\epsilon = 1670 \text{ моль}^{-1} \text{ см}^{-1}$ ) [14]. Время жизни ионной формы пероксинитрита с ростом рН увеличивается, и при рН ~ 13 достигает нескольких суток даже при комнатной температуре [8].

Измерялись спектры поглощения растворов со значениями  $pH_0$  3.11, 5.9, 11.5, 11.9, 12.11 и 12.86. Во всех исходных растворах никаких максимумов в спектрах поглощения при длинах волн от 250 до 400 нм нет. Пример такого спектра для раствора с  $pH_0$  5.9 приведен на рис. 1а.

Сразу после обработки во всех случаях (при всех pH<sub>0</sub>) наблюдается линия 355 нм (рис. 16). Линия может быть связана с нитрозаминами (є ~  $\sim 100$  моль<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>) и ионами NO<sub>2</sub><sup>-</sup> ( $\epsilon \sim 20$  моль<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>). Нитрозамины характеризуются вторым максимумом при 225-245 нм (є ~ 5000 моль<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>). Ионы NO<sub>2</sub> второй максимум не дают. При идентифицированной в работе концентрации [NO<sub>2</sub>] < 10<sup>-4</sup> моль/л эти ионы не могут дать заметный вклад в спектр поглощения. Особенность спектра: наличие максимумов при  $\lambda = 235$  и 355 нм, а также соотношение оптических плотностей этих линий позволяет утверждать, что эти линии связаны с образованием нитрозаминов. Последние были идентифицированы также по максимумам в ИК-спектре в [9]. В течение 3-4 суток максимум при 355 нм пропадает, второй максимум при  $\lambda =$ = 230 нм сильно уменьшается и смещается в сторону более коротких длин волн. Это означает, что нитрозамины распадаются. Зависимость оптиче-



Рис. 1. Оптическая плотность A дистиллированной воды (pH<sub>0</sub> 5.9), исходной (a), сразу после обработки ИР-10 в течение 30 мин, pH 2.72 (б) и после выдержки при комнатной температуре в течение 8 сут, pH 2.7 (в).

ской плотности пика 355 нм от времени выдержки после обработки представлена на рис. 2 (кривая *I*).

На 4–5 сутки после обработки становится заметным пик при  $\lambda = 302$  нм (рис. 1в). В течение первых трех суток его не видно. Зависимость оптической плотности этого пика от времени выдержки после обработки представлена на рис. 2 (кривая 2). Максимум поглощения  $\lambda = 302$  нм может быть связан с пероксинитритом ( $\epsilon = 1670$  моль<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>), либо с ионами азотной кислоты NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Измеренное нами значение  $\epsilon$  для азотной кислоты равно 7  $\pm$  1 моль<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>. Минимальное значение рН по-



**Рис. 2.** Значения оптической плотности *A* полосы 355 (*1*) и 302 нм (*2*) сразу после обработки (t = 0) и после хранения растворов при комнатной температуре до 14 сут. Обрабатывалась вода с рH<sub>0</sub> 5.9.

сле обработки и выдержки 14 сут составляет 2.65 (таблица). Концентрация ионов  $[NO_3^-] = 2.23 \times 10^{-3}$  моль/л, и оптическая плотность, которую могут давать эти ионы,  $A \sim 0.015$ .

Оптическая плотность пика 302 нм начинает заметно расти на 7–8 день после обработки и достигает ~0.05 на 10–11 сут, далее уменьшается.

Так как вклад ионов NO<sub>3</sub><sup>-</sup> в оптическую плотность может составлять 0.015, то пероксинитриту можно приписать максимальную оптическую плотность 0.035 ± 0.01. Эта оптическая плотность соответствует наблюдаемой мгновенной концентрации пероксинитрита (2 ± 1) × 10<sup>-5</sup> моль/л. Оценкой полного количества пероксинитрита, образовавшегося за все время, является суммарный выход ионов

 $NO_3^-$  в течение 14 сут, приводимый в таблице, который составляет для чистой воды с  $pH_0$  5.9  $[NO_3^-] =$ =  $[ONOO^-] = (1.8 \pm 0.4) \times 10^{-3}$  моль/л. С ростом  $pH_0$  выход  $NO_3^-$  (ONOO<sup>-</sup>) растет и достигает (1.2 ± ± 0.5) × 10<sup>-2</sup> моль/л при  $pH_0$  12.11 (таблица).

При высокой мгновенной плотности излучения в момент вспышки разряда возможно образование продуктов, состоящих из HOONO и ONOO<sup>-</sup>. Возможность образования таких продуктов обсуждалась в [15]. Тогда процесс можно представить себе следующим образом. В момент вспышки излучения образуется вещество X, которое распадается:  $X \rightarrow ONOO^-$ . Вещество X само не поглощают свет в УФ и видимом диапазоне. Спектр, характерный для пероксинитрита, появляется на 4–5 день наблюдения, достигает максимума на 10–12 день после обработки и снижается до уровня фона (оптической плотности, которую могут давать ионы

 $NO_3^-$ ) на 14 день наблюдения.

Образованием долгоживущего вещества, распадающегося на пероксинитрит, можно объяснить наблюдавшийся в [16] спорацидный эффект после обработки прибором ИР-10 взвеси спор микромицетов. Споры микромицетов покрыты непрозрачной для света пептидогликановой оболочкой, через которую не может проникать не только УФ-излучение, но и активные короткоживущие частицы, которые гибнут, не успев пройти через многослойную оболочку. В то время, как соединения, живущие около 10 сут, успеют проникнуть внутрь споры, распасться на пероксинитрит, который вызывает необратимые повреждения молекул ДНК [17], в результате чего споры не прорастают и наблюдается 100% спорацидный эффект.

# СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. *Nathan C., Xie Q.W.* // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. P. 13725.
- Genaro A.M., Hortelano S., Alvarez A., Martinez A.C., Bosca L. // J. Clin. Invest. 1995. V. 95. P. 1884.
- 3. Gorman A., McGovan A., Cotter T.G. // FEBS Letters. 1997. V. 404. P. 27.
- Pacher P., Beckman J.S., Liaudet L. // Phys. Rev. 2007. V. 87. № 1. P. 315.
- 5. Зенков Н.К., Меншикова Е.Б., Реутов В.П. // Вестн. РАМН. 2000. № 4. С. 30.
- 6. Kwak J.Y., Han M.K., Choi K.S., Park I.H., Park S.Y., Sohn M.H., Kim U.H., McGregor J.R., Samlowski W.E., Yim C.Y. // Cell. Immunol. 2000. V. 203. P. 84.
- Li D.J., Yan R.W., Luo H., Zou G.L. // Biochemistry. 2005. V. 70. № 10. P. 1423.
- Лобачев В.Л., Рудаков Е.С. // Успехи химии. 2006. Т. 5. С. 422.
- Ivanova I.P., Trofimova S.V., Karpel Vel Leitner N., Aristova N.A., Arkhipova E.V., Burkhina O.E., Sysoeva V.A., Piskarev I.M. // Modern Technologies in Medicine. 2012. № 2. P. 12.
- Пискарев И.М., Иванова И.П., Трофимова С.В., Аристова Н.А. // Химия высоких энергий. 2012. Т. 46. № 5. С. 406.
- 11. Пискарев И.М., Иванова И.П., Трофимова С.В. // Химия высоких энергий. 2013. Т. 47. № 2. С. 152.
- 12. *Ivanova I.P., Piskarev I.M., Trofimova S.V.* // Am. J. Phys. Chem. 2013. V. 2. № 2. P. 44.
- Пискарев И.М., Иванова И.П., Трофимова С.В. // Химия высоких энергий. 2013. Т. 47. № 5. С. 376.
- 14. *Hrabarova E., Gemeiner P., Soltes L. //* Chem. Pap. 2007. V. 61. № 6. P. 417.
- 15. Kissner R., Nauser T., Bugnon P., Lye P.G., Koppenol W.H. // Chem. Res. Toxicol. 1997. V. 10. P. 1285.
- 16. Ivanova I.P., Piskarev I.M., Trofomova S.V. // IOSR Journal of Pharmacy. 2013. V. 3. № 4. P. 51.
- Стародубцева М.Н. Пероксинитрит в физиологии и патологии клеток крови. М.: Книжный дом Либроком, 2011.