

УДК 543.544.53+615.224



Разработка методики количественного определения оксида азота (NO) в тканях крыс с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии

Н.С. Попов¹, Д.А. Гавриленко¹, М.С. Баранов², В.Ю. Балабаньян²

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тверской государственный медицинский университет»

Министерства здравоохранения Российской Федерации,
170100, Россия, г. Тверь, ул. Советская, д. 4

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова»

Министерства здравоохранения Российской Федерации,
117997, Россия, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1

E-mail: ns.popov@mail.ru

Получена 14.07.2023

После рецензирования 28.03.2024

Принята к печати 01.04.2024

Количественная оценка продукции оксида азота (NO) в тканях организма является актуальной задачей фармакологии и биохимии. Изучение физиологических процессов, протекающих с участием NO, а также метаболизма и фармакодинамики фармакологических средств из группы донаторов NO требует внедрения точных и воспроизводимых методик количественного определения данного метаболита в биологических средах.

Цель. Разработка ВЭЖХ-МС/МС методики количественного определения оксида азота в различных тканях крыс.

Материалы и методы. Непрямое количественное определение NO было основано на оценке уровня более стабильных метаболитов: нитритов и нитратов, которые извлекали из тканей крыс путем гомогенизации с водой. Восстановление нитратов до нитритов осуществляли с помощью нитрат редуктазы. В основе дериватизации нитритов использовали реакцию с реактивом Грисса. Полученный азокраситель определяли с помощью ВЭЖХ-МС/МС с использованием аналитической колонки Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 4,6×100 мм, 2,7 мкм. Общее время хроматографического анализа составило 12 минут, время удерживания аналита составило 6,1 минут. Аналитический диапазон методики составил 0,1–100,0 нмоль (в пересчете на нитрит) на 1 мл плазмы или гомогената ткани.

Результаты. Разработанная биоаналитическая методика была валидирована по следующим параметрам: селективность, матричный эффект, степень извлечения, перенос пробы, линейность аналитического диапазона, нижний предел количественного определения (НПКО), внутри- и межсерийная точность и прецизионность, стабильность на всех этапах анализа. Для апробации методики было проведено определение содержания NO в плазме, головном мозге, сердце, аорте и легких крыс.

Заключение. Разработанная биоаналитическая ВЭЖХ-МС/МС-методика полностью соответствует валидационным требованиям. Метрологические характеристики методики позволяют с высокой точностью оценить продукцию NO в различных тканях крыс, что, несомненно, представляет актуальным и востребованным в исследовании патологических процессов, а также механизма действия фармакологических средств из группы донаторов NO.

Ключевые слова: ВЭЖХ-МС/МС; хроматография; масс-спектрометрия; эндотелиальный релаксирующий фактор; оксид азота

Список сокращений: NO – оксид азота / эндотелиальный релаксирующий фактор; ВЭЖХ-МС/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием; IS – внутренний стандарт; AUC – площадь под кривой хроматографического пика; NADH – никотинамидаденинадинуклеотид; MRM – мониторинг множественных реакций; НПКО – нижний предел количественного определения; ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота; NMF – нормированный матричный фактор; CV – коэффициент вариации; SD – стандартное отклонение; DP – декластеризующий потенциал; CEP – напряжение на входе в ячейку соударений; CE – энергия столкновений; CXP – выходной потенциал ячейки соударений.

Для цитирования: Н.С. Попов, Д.А. Гавриленко, М.С. Баранов, В.Ю. Балабаньян. Разработка методики количественного определения оксида азота (NO) в тканях крыс с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии. *Фармация и фармакология*. 2024;12(1):49-62. DOI: 10.19163/2307-9266-2024-12-1-49-62

© Н.С. Попов, Д.А. Гавриленко, М.С. Баранов, В.Ю. Балабаньян, 2024

For citation: N.S. Popov, D.A. Gavrilenko, M.S. Baranov, V.Yu. Balabanyan. Development of a method for quantitative determination of nitric oxide (NO) in rat tissues based on high-performance liquid chromatography and mass spectrometry. *Pharmacy & Pharmacology*. 2024;12(1):49-62. DOI: 10.19163/2307-9266-2024-12-1-49-62

Development of a method for quantitative determination of nitric oxide (NO) in rat tissues based on high-performance liquid chromatography and mass spectrometry

N.S. Popov¹, D.A. Gavrilenko¹, M.S. Baranov², V.Yu. Balabanyan²

¹ Tver State Medical University,

4, Sovetskaya Str., Tver, Russia, 170100

² Pirogov Russian National Research Medical University,

1, Ostrovityanov Str., Moscow, Russia, 117997

E-mail: ns.popov@mail.ru

Received 14 July 2023

After peer review 28 March 2024

Accepted 01 April 2024

A quantitative assessment of nitric oxide (NO) production in body tissues is an urgent problem in pharmacology and biochemistry. The study of physiological processes occurring with the participation of NO, as well as the metabolism and pharmacodynamics of pharmacological agents from the group of NO donors, requires the introduction of accurate and reproducible methods for the quantitative determination of this metabolite in biological media.

The aim of the study was to develop the HPLC-MS/MS methods for the quantitative determination of NO in various tissues of rats.

Materials and methods. The indirect NO quantification was based on estimation of the level of more stable metabolites: nitrites and nitrates extracted from rat tissues by homogenization with water. The reduction of nitrates to nitrites was carried out using nitrate reductase. The derivatization of nitrites was based on a reaction with Griess reagent. The resulting azo dye was determined by HPLC-MS/MS using an Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 4.6×100 mm, 2.7 μm analytical column. The total chromatographic analysis time was 12 minutes, and the analyte retention time was 6.1 minutes. The analytical range of the method was 0.1–100.0 nmol (in terms of nitrite) per 1 ml of plasma or tissue homogenate.

Results. The developed a bioanalytical method was validated according to the following parameters: a selectivity, a matrix effect, a recovery degree, a sample transfer, an analytical range linearity, a lower limit of quantification (LLOQ), an intra- and inter-assay accuracy and precision, and a stability at all the stages of the analysis. To test the method, the NO content in the plasma, brain, heart, aorta and lungs of rats was determined.

Conclusion. The developed bioanalytical HPLC-MS/MS methods fully meets the validation requirements. The metrological characteristics of the technique make it possible to highly accurately estimate the NO production in various tissues of rats, which is undoubtedly relevant and in demand in the study of pathological processes as well as the mechanism of action of pharmacological agents from the group of NO donors.

Keywords: HPLC-MS/MS; chromatography; mass spectrometry; endothelial relaxing factor; nitric oxide

Abbreviations: NO – nitric oxide / endothelial relaxing factor; HPLC-MS/MS – high-performance liquid chromatography with mass spectrometric detection; IS – internal standard; AUC – area under the concentration-time curve; NADH – nicotinamide adenine dinucleotide; MRM – multiple reaction monitoring; LLOQ – lower limit of quantitation; EDTA – ethylenediaminetetraacetic acid; NMF – normalized matrix factor; CV – coefficient of variation; SD – standard deviation; DP – declustering potential; EP – entrance potential; CE – collision energy; CXP – collision cell exit potential.

ВВЕДЕНИЕ

К настоящему времени имеется достаточное количество данных об участии оксида азота (NO) в регуляции целого ряда биологических процессов в организме [1, 2]. Известно, что NO участвует в регуляции тонуса сосудов и системных гемодинамических реакций [3, 4], является ингибитором пролиферации гладкомышечных клеток [5, 6], играет важную роль в системе гемостаза [7, 8] и защите слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта [9, 10]. Кроме того, доказана роль NO в развитии и прогрессировании многих неврологических, психиатрических и нейродегенеративных расстройств [11–13]. Снижение продукции NO, представляющее собой одну из причин эндотелиальной дисфункции, является одним из ранних признаков ишемической болезни сердца и атеротромбоза [14]. В то же время дисфункция

эндотелия имеет важное значение в развитии таких патологических состояний, как гиперхолестеринемия, сахарный диабет 2 типа, артериальная гипертензия, сердечная недостаточность [15, 16].

Накопление данных об участии NO в многочисленных путях биорегуляции позволило не только изучить патогенез многих заболеваний, но и расширить возможности использования органических нитратов и других донаторов NO в клинической практике. Известно, что кинетика высвобождения NO из фармакологически активных веществ зависит от многих факторов, среди которых ключевую роль играют химическое строение, реакционная способность, а также активность тех или иных ферментов [17].

Изучение физиологических процессов, протекающих с участием NO, а также метаболизма

и фармакодинамики фармакологических средств из группы донаторов NO требует внедрения точных и воспроизводимых методик количественного определения данного метаболита в биологических средах. Главным образом, оценка продукции NO осуществляется путем измерения концентрации его более стабильных метаболитов – нитритов, которые в свою очередь определяются колориметрически после взаимодействия с реактивом Грисса [18]. Однако этот широко используемый метод непрямого определения NO имеет ряд существенных недостатков. Во-первых, реактив Грисса может вступать в химическое взаимодействие с различными компонентами биологической матрицы с образованием окрашенных продуктов, изменяющих оптическую плотность анализируемых проб [19, 20]. Во-вторых, данная методика требует тщательного удаления белковых компонентов, так как нахождение их в готовых к фотометрическому анализу пробах также влияет на величину измеряемой оптической плотности [21]. В-третьих, фотометрическое детектирование часто не обеспечивает необходимый уровень чувствительности [22]. Кроме того, данный метод не предусматривает осуществление внутреннего контроля на протяжении всех этапов анализа (использование внутреннего стандарта). Вышеперечисленные недостатки требуют совершенствования данного метода количественного определения продукции NO в направлении повышения селективности и чувствительности детектирования продукта реакции. Одним из таких решений является использование с этой целью высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-селективным детектированием.

ЦЕЛЬ. Разработка ВЭЖХ-МС/МС методики количественного определения оксида азота в различных тканях крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные

В процессе разработки и валидации методики использовали биологический материал, полученный от 6 интактных крыс линии Wistar мужского пола массой 200–220 г (питомник ООО «СМК СТЕЗАР», Россия). Животных содержали в условиях вивария ФГБОУ ВО «Тверской государственный медицинский университет» Минздрава России в пластиковых клетках с сетчатой крышкой, оборудованных кормушкой и поилкой. В качестве подстила использовали стерильные древесные стружки. Клетки с крысами находились в контролируемых условиях окружающей среды (температура 20–26°C, относительная влажность 30–70%). В комнатах содержания животных поддерживался 12-часовой цикл освещения и 8–10-тикатная смена объема воздуха в час. Крыс кормили полнорационным комбикормом ПК-120 (ООО «Провими», Россия),

корм и фильтрованную водопроводную воду давали *ad libitum*. Чистку клеток осуществляли ежедневно, бутылки с водой заменяли на новые также каждый день. Влажная уборка помещений содержания проводилась ежедневно. Вечером накануне эксперимента животные были лишены корма.

Животных выводили из эксперимента путем декапитации с помощью гильотины (производитель «Open Science») под легкой общей анестезией, выполненной с использованием комбинации препаратов золазепам и тилетамин (Золетил® 100 мг/мл, Virbac, Франция). Кровь собирали в пробирки, содержащие ЭДТА, плазму получали путем центрифугирования при 3000 g в течение 10 мин. Затем отбирали фрагменты внутренних органов (головной мозг, сердце, аорта, легкие), которые использовали для получения гомогенатов.

Этическая экспертиза

Данное исследование было одобрено Локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «Тверской государственный медицинский университет» Минздрава России (протокол заседания № 4 от 29.05.2019 г.). Все эксперименты были выполнены в соответствии с Правилами лабораторной практики, утвержденными приказом Минздрава России от 23.08.2010 г. № 708н и Директивой Европейского парламента и Совета Европейского Союза 2010/63/ЕС по защите позвоночных животных, используемых для научных целей.

Описание экспериментальной части

Так как NO является газообразным метаболитом со сравнительно малым временем полужизни в живых тканях организма, его не прямое количественное определение было основано на оценке уровня более стабильных метаболитов – нитритов и нитратов (Рис. 1).

В основе дериватизации нитритов использовали общеизвестную реакцию с реактивом Грисса (Рис. 2). Восстановление нитратов до нитритов осуществляли с помощью нитрат редуктазы.

Пробоподготовка тканей крыс включала в себя несколько этапов: гомогенизацию с деионизированной водой, восстановление нитратов, дериватизация полученных нитритов, депотеинизация. Получение гомогенатов осуществляли следующим образом: в предварительно тарированную на аналитических весах ВЛ-124 («Госметр», Россия) пробирку типа Эппендорф объемом 2 мл помещали фрагмент ткани, после определения точной массы добавляли воду из расчета 400 мкл на 100 мг ткани с помощью автоматического дозатора переменного объема («Eppendorf Research Plus», Германия), помещали шарик из кварцевого стекла диаметром 5 мм, после чего гомогенизировали на вибротельнице с частотой возвратно-поступательных движений

50 Гц и амплитудой 30 мм в течение 15 мин. Для увеличения выхода нитратов и нитритов из биоматериала пробирки дополнительно выдерживали в ультразвуковой ванне (Мегеон, КНР) в течение 10 мин. Отделение жидкой части гомогената осуществляли центрифугированием при 16 000 g и температуре +4°C продолжительностью 15 мин. Супернатант переносили в отдельные пробирки типа Эппендорф объемом 0,5 мл, немедленно замораживали и хранили при температуре -40°C до проведения анализа. На начальном этапе пробоподготовка плазмы крови включала в себя разбавление водой в 5 раз.

Перед проведением процедуры восстановления нитратов и дериватизации полученных нитритов готовили необходимые растворы и реагенты. Фосфатный буферный раствор получали следующим образом: в мерную колбу вместимостью 1000 мл вносили 3,75 г однозамещенного фосфата калия («PanReas Applichem», Испания), 10 мг этилендиаминтетраацетата натрия дигидрата («PanReas Applichem», Испания), 1,4 г калия гидроксида («Millipore», Германия) и доводили деионизированной водой до метки. Полученный раствор хранили в холодильнике при температуре +4°C не более 6 мес. Исходный раствор (2 мг/мл) восстановленного β -никотинамидаденинадинуклеотида (NADH) готовили путем добавления к 10 мг лиофилизированной субстанции («R&D Systems», США) 5 мл деионизированной воды. Полученный реагент по 1 мл переносили в пробирки Эппендорфа, использовали немедленно или замораживали и хранили при температуре -20°C в течение 1 мес. Рабочий раствор NADH готовили путем разбавления 1 мл исходного раствора фосфатным буфером в 10 раз, использовали в течение дня. Исходный раствор нитратредуктазы («R&D Systems», США) готовили путем реконституирования 1 Ед лиофилизированной субстанции в 1 мл фосфатного буфера, хранили на льду не более 8 ч. Непосредственно перед использованием исходный раствор разбавляли в 5 раз.

Полученный на предыдущем этапе супернатант гомогенатов тканей (или разбавленную плазму) помещали в чистые микроцентрифужные пробирки в объеме 20 мкл, добавляли по 10 мкл рабочего раствора NADH и реконституированной нитратредуктазы, перемешивали на вортке V1 plus («Biosan», Латвия) 10 секунд, после чего инкубировали в твердотельном термостате TDB-120 («Biosan», Латвия) в течение 30 мин при 37°C.

Заключительный этап пробоподготовки включал в себя дериватизацию нитритов с помощью реактива Грисса и последующую депротеинизацию. С этой целью образцы после термостатирования переносили на ледяную баню, добавляли

20 мкл охлажденного 1% раствора сульфаниламида («Merck», Германия) в 2 н водном растворе хлористоводородной кислоты («Merck», Германия), выдерживали 5 мин. Затем в пробирки вносили 20 мкл 0,1% раствора N-(1-нафтил)этилендиамина («Merck», Германия) в 2 н водном растворе хлористоводородной кислоты, инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут. Осаждение белков осуществляли путем добавления к образцам 200 мкл охлажденного до -20°C метанола, содержащего внутренний стандарт (4-[4-амино-1-нафтилазо]бензолсульфонамид, 1000 нг/мл) (Рис. 3). Образцы выдерживали в термостатируемом шейкере TS-100 С («Biosan», Латвия) при температуре 4°C и частоте колебаний 1400 об/мин в течение 5 мин, после чего надосадочную жидкость отделяли центрифугированием при ускорении 16 000 g и температуре 4°C в течение 15 мин. Полученный супернатант переносили в полиэтиленовые вставки для хроматографических виал и использовали для проведения ВЭЖХ-МС/МС анализа.

Хроматографическое разделение проводили с помощью ВЭЖХ 1260 Infinity II («Agilent Technologies», Германия) в обращенно-фазовом режиме с использованием аналитической колонки Poroshell InfinityLab 120 EC-C18 4,6×100 мм, 2,7 мкм («Agilent Technologies», США) в сочетании с предколонкой Zorbax Eclipse Plus C18 4,6×12,5 мм, 5 мкм («Agilent Technologies», США).

Детектирование аналита и внутреннего стандарта при осуществлении хроматографического анализа проводили с помощью tandemного квадрупольного масс-спектрометра AB Sciex QTrap 3200 MD («Sciex», Сингапур), оснащенного источником ионов с зондом химической ионизации при атмосферном давлении. Подбор оптимальных параметров масс-спектрометрической детекции проводили при непрерывном введении в источник ионов индивидуальных растворов (100,0 нг/мл) азокрасителей (аналит и внутренний стандарт) в метаноле с добавлением 0,1% муравьиной кислоты с помощью шприцевого насоса со скоростью 10 мкл/мин. На первом этапе для азокрасителей определяли m/z протонированных молекул (масс-спектр первого порядка), подбирали оптимальные значения декластеризующего потенциала (DP) и напряжения на входе в ячейку соударений (EP). На втором этапе для установленных ионов-предшественников определяли масс-спектры ионов-продуктов, выбирали 2 характеристических иона, для которых подбирали оптимальные значения энергии столкновений (CE) и выходного потенциала ячейки соударений (CXP). Полученные значения были использованы для детекции азокрасителей в режиме мониторинга множественных реакций (MRM) и обеспечивали достижение наилучшей чувствительности.

Статистическая обработка

Обработку первичных данных хромато-масс-спектрометрического анализа выполняли с помощью встроенного программного обеспечения (ПО) AB Sciex Analyst 1.3.6, для расчета значений валидационных параметров использовали ПО Microsoft Office Excel 365 (Microsoft, США).

Валидацию методики проводили по следующим параметрам: селективность, матричный эффект, степень извлечения, перенос пробы, линейность аналитического диапазона, нижний предел количественного определения (НПКО), внутри- и межсерийная точность и прецизионность, стабильность на всех этапах анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для продукта дериватизации нитритов (азокрасителя) и внутреннего стандарта были получены масс-спектры первого и второго порядка (Рис. 4). Для аналита и внутреннего стандарта были выбраны два характеристических иона-продукта, для которых были подобраны условия детектирования, обеспечивающие максимальный ионный ток (табл. 1).

Хроматографическое определение азокрасителей осуществляли с использованием обращенно-фазовой колонки. Использование метанола в качестве компонента подвижной фазы с большей элюирующей силой по сравнению с ацетонитрилом позволило получить более узкие и высокие пики как аналита, так и внутреннего стандарта. Кроме того, применение ацетонитрила существенно увеличивало НПКО 4-[4-(2-аминоэтиламино)-1-нафтилазо]бензолсульфонамида, что не позволяло достичь необходимого уровня чувствительности. Таким образом, элюирование осуществляли смесью деионизированной воды (А) и метанола (В) с добавлением 0,1% муравьиной кислоты в градиентном режиме (табл. 2). Время удерживания 4-[4-(2-аминоэтиламино)-1-нафтилазо]бензолсульфонамида и 4-[4-амино-1-нафтилазо]бензолсульфонамида (внутренний стандарт) составило 6,1 и 6,5 мин соответственно (Рис. 5).

Для определения метрологических характеристик разрабатываемой методики была приготовлена и проанализирована серия стандартных образцов с содержанием нитрита: 0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 50,0; 100,0 нмоль/мл в пересчете на гомогенат. По причине отсутствия свободной от нитритов биологической матрицы потребовалось доказательство возможности использования деионизированной воды в качестве ее заменителя. Для этого был проведен эксперимент с добавлением рабочих растворов нитрита к аликватам гомогенатов тканей крыс с последующим проведением процедуры пробоподготовки, включая стадии восстановления нитратов и дериватизации полученных нитритов [23]. Калибровочную кривую, полученную по результатам анализа образцов, приготовленных на деионизированной воде, использовали для

определения содержания нитритов в стандартных образцах, приготовленных на гомогенатах. Определяли разность между установленной по калибровочной зависимости концентрацией нитритов и концентрацией стандартных растворов с добавкой без учета эндогенного уровня аналита. Стандартные растворы получали путем добавления к 90 мкл деионизированной воды (или гомогената ткани) 10 мкл соответствующего 10-кратного рабочего раствора нитрита, после чего проводили пробоподготовку полученных образцов по вышеописанной методике. Кроме этого, сравнивали коэффициенты наклона калибровочных кривых, полученных по результатам анализа серии стандартных образцов, приготовленных на воде и на соответствующих гомогенатах.

По результатам эксперимента было установлено, что значения коэффициента вариации разности концентраций для гомогенатов мозговой ткани, миокарда, аорты, а также плазмы крови крыс на протяжении всего аналитического диапазона составили от 7,9 до 10,3%. Лишь для гомогената легких величина относительного стандартного отклонения была приближена к 15%. Значения отношения коэффициентов наклона калибровочных кривых, полученных по результатам анализа образцов на деионизированной воде (0,0741) и гомогенатах тканей, составили от 0,887 до 1,114 (табл. 3). Таким образом, использование калибровочных стандартных образцов, приготовленных на деионизированной воде, существенно не отражалось на правильности определения концентрации нитритов в биологических объектах.

Оценку матричного эффекта и степени извлечения проводили по результатам анализа образцов с добавлением 4-[4-(2-аминоэтиламино)-1-нафтилазо]бензолсульфонамида (аналита) в количествах, эквивалентных условному содержанию нитрита в низких (8,0 нмоль/мл) и высоких (80,0 нмоль/мл) концентрациях в пределах аналитического диапазона методики. Матричный эффект был рассчитан как отношение площади хроматографического пика аналита в неэкстрагированном образце (*post-spike sample*) к усредненному значению сигнала аналита в деионизированной воде (*solvent-spike sample*, $n=6$). За нормированный матричный фактор (NMF) принимали отношение нормированного на внутренний стандарт (IS) значения площади пика аналита в *post-spike sample* на усредненное значение отношения нормированного на IS значения площади пика аналита в *solvent-spike sample*.

Степень извлечения определяли как отношение площадей хроматографических пиков в экстрагированном образце (*pre-spike sample*) и неэкстрагированном образце (*post-spike sample*), выраженное в процентах. Результаты оценки эффекта матрицы и степени извлечения представлены в таблице 4.

Значения коэффициента вариации для NMF менее 15% показали¹, что использование в качестве внутреннего стандарта 4-[4-амино-1-нафтилазо]бензолсульфонамида позволяет эффективно компенсировать влияние компонентов биологической матрицы на интенсивность сигнала аналита. Средняя степень извлечения аналита находится в пределах 91,78–94,97% с максимальным разбросом значений (CV) 7,79%², что свидетельствует о практически количественном экстрагировании продукта дериватизации нитритов из биологического материала.

Оценку селективности методики проводили путем сравнения отношений площадей хроматографических пиков двух ионов-продуктов азокрасителей (аналита и внутреннего стандарта) при анализе образцов на деионизированной воде и гомогенатах тканей. Было установлено, что для высокой и низкой концентрации нитритов разность этих значений не превышала 5% для аналита и 1% для IS³.

Кроме того, проводили сравнительную характеристику хроматограмм биологических образцов, анализ которых был проведен без предварительной процедуры дериватизации нитритов, и образцов, в которые был добавлен 4-[4-(2-аминоэтиламино)-1-нафтилазо]бензолсульфонамид (аналит) в количестве, эквивалентном содержанию нитритов на уровне НПКО. Результаты оценки селективности методики представлены в таблице 5.

Отклик аналита в интактных образцах не превышал 10,6% отклика в образцах НПКО, для IS аналогичный показатель составлял менее 0,22%, что доказывает высокую селективность разработанной методики⁴.

По результатам анализа серии стандартных образцов был построен калибровочный график, отражающий зависимость отношения площади пика продукта дериватизации нитритов к площади пика IS от концентрации аналита в стандартном образце (Рис. 6). Данная зависимость представлена в виде уравнения линейной регрессии $y=0,0735x+0,0123$ (нормирование $1/x^2$) с коэффициентом корреляции 0,9959. Аналитический диапазон методики составил от 0,1 до 100 нмоль/мл условного содержания нитрита.

Так как в природе отсутствует свободная от продуктов метаболизма NO биологическая матрица, НПКО для нитритов оценивали по результатам хроматографического анализа аналитических

стандартов, приготовленных на деионизированной воде. За НПКО принимали минимальное условное содержание нитритов в 1 мл гомогената ткани, которое может быть определено со значениями относительного стандартного отклонения и относительной погрешности не более 20%⁵, при этом отношение «сигнал-шум» на хроматограмме должно быть 5:1⁶. Значение НПКО для нитритов составило 0,1 нмоль/мл. Фрагмент хроматограммы стандартного образца с содержанием нитритов на уровне НПКО представлен на рисунке 7.

Перенос веществ во время анализа оценивали путем сравнения хроматограмм холостых образцов, проанализированных после шестикратного ввода пробы с концентрацией нитрита 100 нмоль/мл, с хроматограммами образцов НПКО (0,1 нмоль/мл). По результатам анализа было установлено, что отношение площадей пиков в холостых образцах к площадям пиков в образцах НПКО было ниже максимально допустимого уровня (20% для аналита и 5% для IS), что свидетельствует о незначительном переносе веществ при переходе от большей концентрации к меньшей.

Точность и прецизионность методики рассчитывали по результатам анализа 5 контрольных образцов для каждого из четырех уровней концентраций нитритов: НПКО (0,1 нмоль/мл), низкая концентрация (НК – 8,0 нмоль/мл), низкая концентрация (СК – 40,0 нмоль/мл), высокая концентрация (ВК – 80,0 нмоль/мл) в трех независимых сериях. Точность была выражена в процентах, как отношение измеренной концентрации в контрольных образцах к номинальному содержанию нитрита (E). Прецизионность определяли по коэффициенту вариации (CV) результатов пятикратного определения концентрации нитрита. Критерием приемлемости считали значение CV и относительной погрешности для уровня НПКО – не более 20%, для остальных концентраций – не более 15%. Результаты внутри- и межсерийной точности и прецизионности представлены в таблице 6.

Результаты оценки стабильности подтвердили неизменность свойств исходных и рабочих растворов нитрита в течение 3 мес. Растворы сульфаниламида и N-(1-нафтил)этилендиамина, используемые для дериватизации нитритов, сохраняли свою реакционную способность в течение 1 года при хранении в холодильнике. Водный раствор β -никотинамидаденинадинуклеотида (2 мг/мл) оставался стабильным в замороженном состоянии при -20°C в течение 1 мес. Оценку реакционной способности реконституированной нитратредуктазы после хранения не проводили, так как каждый раз использовали свежеприготовленный раствор. Исходный раствор IS в метаноле (1 мг/мл) сохранял свою стабильность в течение 1 года при температуре -20°C .

¹ Требования к валидации биоаналитических методик испытаний и анализу исследуемых биологических образцов (Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 85 (ред. от 15.02.2023) Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза).

² Там же.

³ Там же.

⁴ Там же.

⁵ Там же.

⁶ Там же.

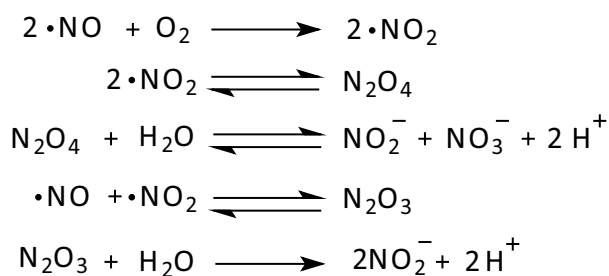


Рисунок 1 – Уравнения химических реакций образования метаболитов эндотелиального релаксирующего фактора (оксида азота)

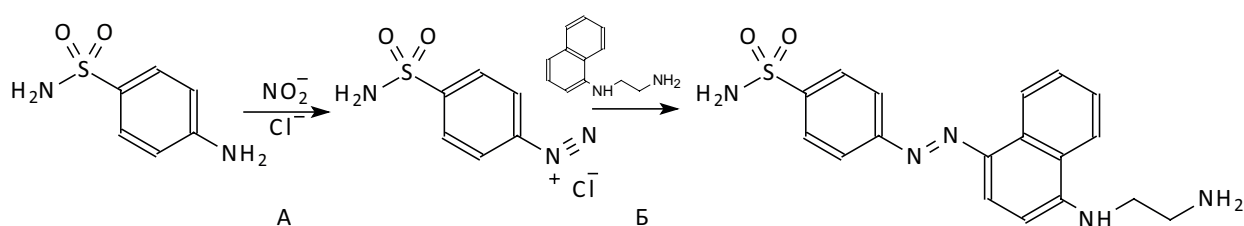


Рисунок 2 – Реакция образования азокрасителя (А – диазотирование сульфаниламида, Б – азосочетание иона диазония с N-(1-нафтил)этилендиамином)

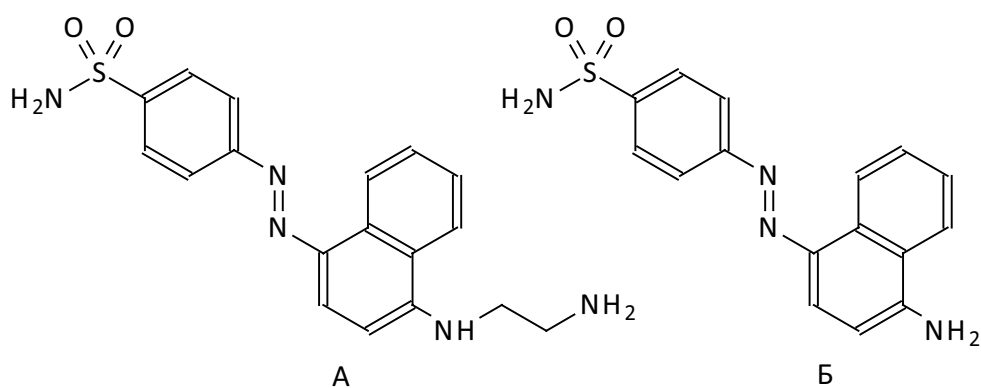


Рисунок 3 – Химическая структура аналита (А – 4-[4-(2-аминоэтиламино)-1-нафтилазо]бензолсульфонамид) и внутреннего стандарта (Б – 4-[4-амино-1-нафтилазо]бензолсульфонамид)

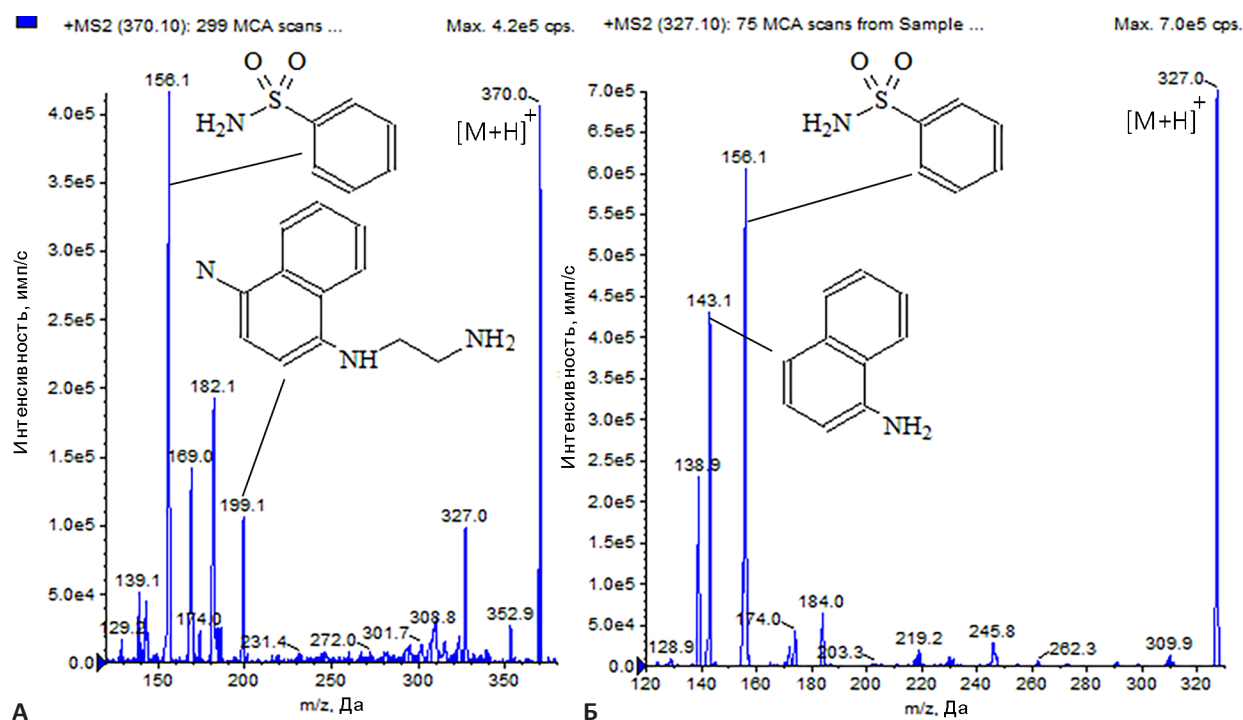


Рисунок 4 – Масс-спектры фрагментарных ионов анализта (А – 4-[4-(2-аминоэтиламино)-1-нафтилазо]бензолсульфонамид) и внутреннего стандарта (Б – 4-[4-амино-1-нафтилазо]бензолсульфонамид)

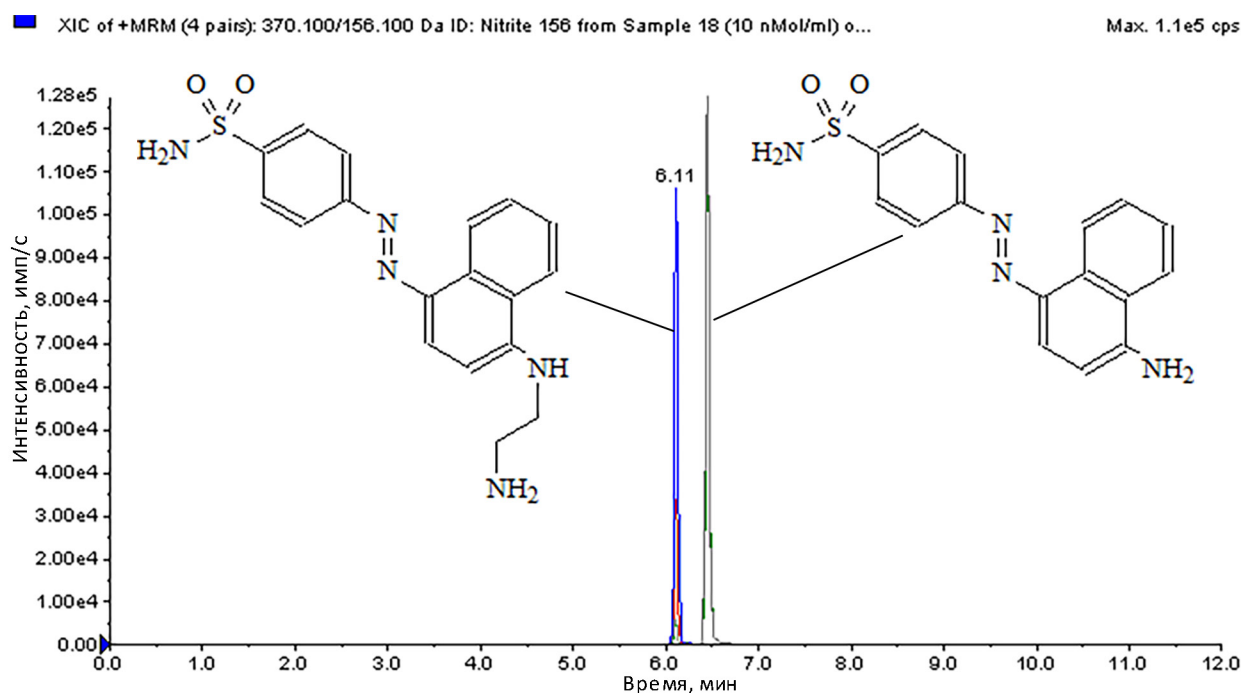


Рисунок 5 – Хроматограмма стандартного образца с концентрацией нитрита 10,0 нмоль/мл

Примечание: подвижная фаза – метанол и деионизированная вода с добавлением 0,1% муравьиной кислоты; режим элюирования – градиентный; хроматографическая колонка - InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 4,6×100 мм, 2,7 мкм; температура колонки – 30°C; аликвота – 5 мкл.

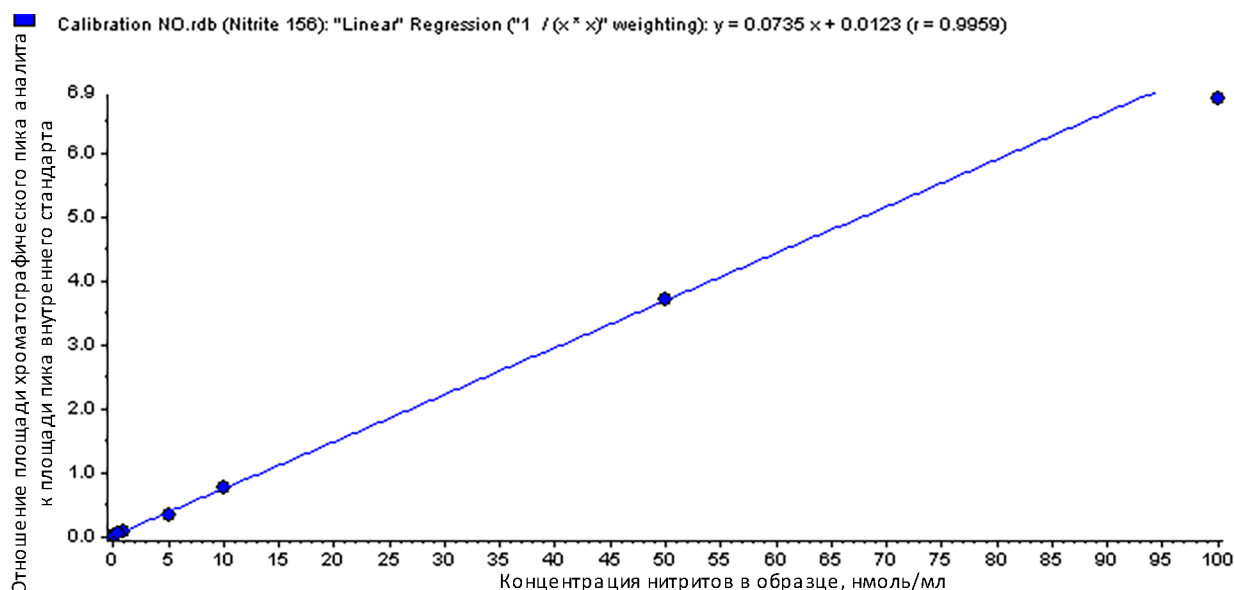


Рисунок 6 — Калибровочная кривая для количественного определения нитритов в гомогенатах тканей крыс

Примечание: по горизонтальной оси — концентрация нитритов в стандартном образце, нмоль/мл; по вертикальной оси — отношение площади хроматографического пика аналита к площади пика внутреннего стандарта.

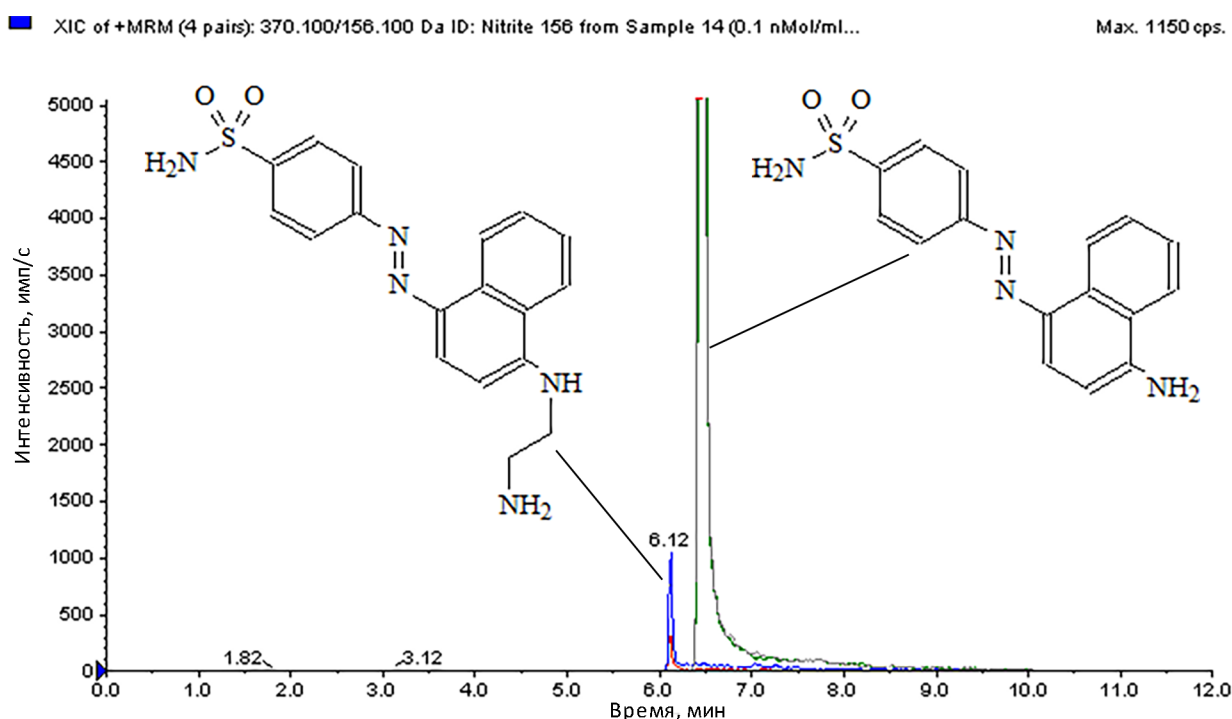


Рисунок 7 — Фрагмент хроматограммы стандартного образца с концентрацией нитрита на уровне НПКО 0,1 нмоль/мл

Примечание: отношение сигнал/шум — 28:1; подвижная фаза — метанол и деионизированная вода с добавлением 0,1% муравьиной кислоты; режим элюирования — градиентный; хроматографическая колонка — InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 4,6×100 мм, 2,7 мкм; температура колонки — 30°C; аликвота — 5 мкл.

Таблица 1 – Параметры масс-спектрометрического детектирования продукта дериватизации нитритов (азокрасителя) и внутреннего стандарта

Источник ионов	Heated Nebulizer				
Метод ионизации	Химическая ионизация при атмосферном давлении (APCI)				
Режим ионизации	Положительный				
Температура источника ионов, °C	400,0				
Напряжение источника ионов, В	5500,0				
Давление газа завесы, <i>psi</i>	20,0				
Давление газа источника ионов, <i>psi</i>	30,0				
Напряжение ввода, В	10				
Минимальное время измерения, мсек	200				
Ионы-продукты	MRM, <i>m/z</i>	DP, В	CEP, В	CE, эВ	CXP, В
Аналит	370,1/156,1	67,0	21,0	37,0	2,5
4-[4-(2-аминоэтиламино)-1-нафтилазо]бензолсульфонамид	370,1/199,1			28,0	3,3
Внутренний стандарт	327,1/156,1	86,0	18,2	32,8	2,7
4-[4-амино-1-нафтилазо]бензолсульфонамид	327,1/143,1			37,0	2,6

Примечание: DP – декластеризующий потенциал; CEP – напряжение на входе в ячейку соударений; CE – энергия столкновений; CXP – выходной потенциал ячейки соударений.

Таблица 2 – Хроматографические параметры определения продукта дериватизации нитритов

Хроматографическая колонка	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 4,6×100 мм, 2,7 мкм			
Элюент А	Деионизированная вода+0,1% муравьиная кислота			
Элюент В	Метанол+0,1% муравьиная кислота			
Программа градиента	Время, мин	Скорость потока, мкл/мин	% А	%В
	0,0		90	10
	4,0		0	100
	8,0	500	0	100
	8,01		90	10
	12,0		90	10
Температура термостата колонки, °C	30			
Объем пробы, мкл	5			
Общая продолжительность анализа, мин	12			
Промывка инжектора	Через порт промывки, 3 секунды, 50% водный раствор метанола			

Таблица 3 – Результаты эксперимента для исследуемых гомогенатов с добавлением стандартов

Концентрация нитритов в воде, нмоль/мл	0,1	0,5	1,0	5,0	10,0	50,0	100,0	Среднее, нмоль/мл	SD, нмоль/мл	CV, %
Плазма крови										
Концентрация нитритов с добавкой, нмоль/мл	6,3	6,0	6,8	11,8	16,8	56,4	106,0	–		
Разность концентраций, нмоль/мл	6,2	5,5	5,8	6,8	6,8	6,4	6,0	6,2	0,5	7,9
Коэффициент наклона калибровочной кривой	0,0751	Отношение коэффициентов наклона калибровочных кривых							1,014	
Гомогенат головного мозга										
Концентрация нитритов с добавкой, нмоль/мл	25,2	24,3	24,9	29,8	32,6	71,3	118,4	–		
Разность концентраций, нмоль/мл	25,1	23,8	23,9	24,8	22,6	21,3	18,4	22,8	2,4	10,3
Угловой коэффициент уравнения линейной регрессии	0,0657	Отношение коэффициентов наклона калибровочных кривых							0,887	
Гомогенат сердца										
Концентрация нитритов с добавкой, нмоль/мл	20,7	21,3	22,1	26,9	33,1	74,4	125,1	–		
Разность концентраций, нмоль/мл	20,6	20,8	21,1	21,9	23,1	24,4	25,1	22,4	1,8	8,0
Угловой коэффициент уравнения линейной регрессии	0,0825	Отношение коэффициентов наклона калибровочных кривых							1,114	
Гомогенат аорты										
Концентрация нитритов с добавкой, нмоль/мл	18,6	18,8	19,4	26,4	28,1	69,4	116,2	–		
Разность концентраций, нмоль/мл	18,5	18,3	18,4	21,4	18,1	19,4	16,2	18,6	1,6	8,4
Угловой коэффициент уравнения линейной регрессии	0,0711	Отношение коэффициентов наклона калибровочных кривых							0,959	
Гомогенат легких										
Концентрация нитритов с добавкой, нмоль/мл	7,8	7,6	7,8	11,6	16,4	55,3	105,1	–		
Разность концентраций, нмоль/мл	7,7	7,1	6,8	6,6	6,4	5,3	5,1	6,4	0,9	14,6
Угловой коэффициент уравнения линейной регрессии	0,0695	Отношение коэффициентов наклона калибровочных кривых							0,938	

Примечание: SD – стандартное отклонение, CV – коэффициент вариации.

Таблица 4 – Результаты оценки матричного эффекта и степени извлечения

Показатели	AUC аналита <i>post-spike sample</i>	AUC IS <i>post-spike sample</i>	AUC аналита/ AUC IS	AUC аналита <i>solvent-spike sample</i>	AUC IS <i>solvent-spike sample</i>	AUC аналита <i>pre-spike sample</i>	NMF	Степень извлечения, %
Плазма крови (8,0 нмоль/мл)								
Среднее	247200	397600	0,62	246400	391600	232600	0,99	94,48
SD	16783	8561	0,04	13446	5941	3781	0,07	7,36
CV, %	6,79	2,15	7,19	5,46	1,52	1,63	7,19	7,79
Гомогенат мозга (8,0 нмоль/мл)								
Среднее	221800	372400	0,60	246400	391600	208600	0,95	94,02
SD	9338	8324	0,03	13446	5941	12915	0,06	3,50
CV, %	4,21	2,24	5,87	5,46	1,52	6,19	5,87	3,72
Гомогенат сердца (8,0 нмоль/мл)								
Среднее	221400	375000	0,59	246400	391600	203200	0,94	91,78
SD	24130	18439	0,06	13446	5941	22286	0,10	1,18
CV, %	10,90	4,92	10,96	5,46	1,52	10,97	10,96	1,29
Гомогенат аорты (8,0 нмоль/мл)								
Среднее	229200	364400	0,63	246400	391600	215400	1,00	94,11
SD	13179	7893	0,04	13446	5941	7829	0,06	3,76
CV, %	5,75	2,17	6,41	5,46	1,52	3,63	6,41	3,99
Гомогенат легких (8,0 нмоль/мл)								
Среднее	198600	362200	0,55	246400	391600	185600	0,87	93,48
SD	10064	13311	0,03	13446	5941	9710	0,05	2,58
CV, %	5,07	3,68	6,20	5,46	1,52	5,23	6,20	2,76
Плазма крови (80,0 нмоль/мл)								
Среднее	2232000	395400	5,64	2268000	398800	2104000	0,99	94,28
SD	101341	6107	0,19	106864	10710	85029	0,03	0,91
CV, %	4,54	1,54	3,36	4,71	2,69	4,04	3,36	0,96
Гомогенат мозга (80,0 нмоль/мл)								
Среднее	2122000	385200	5,51	2268000	398800	2014000	0,97	94,97
SD	107564	13368	0,31	106864	10710	92897	0,05	3,09
CV, %	5,07	3,47	5,57	4,71	2,69	4,61	5,57	3,25
Гомогенат сердца (80,0 нмоль/мл)								
Среднее	2214000	375000	2214000	2268000	398800	2084000	1,04	93,92
SD	241309	18439	241309	106864	10710	290740	0,11	4,96
CV, %	10,90	4,92	10,90	4,71	2,69	13,95	10,96	5,28
Гомогенат аорты (80,0 нмоль/мл)								
Среднее	2136000	393800	5,42	2268000	398800	1996000	0,95	93,33
SD	154370	16407	0,32	106864	10710	185687	0,06	2,59
CV, %	7,23	4,17	5,93	4,71	2,69	9,30	5,93	2,78
Гомогенат легких (80,0 нмоль/мл)								
Среднее	1884000	387200	4,87	2268000	398800	1744000	0,86	92,47
SD	59414	17922	0,27	106864	10710	132778	0,05	4,16
CV, %	3,15	4,63	5,57	4,71	2,69	7,61	5,57	4,50

Примечание: AUC – площадь под кривой хроматографического пика; IS – внутренний стандарт; NMF – нормированный матричный фактор; SD – стандартное отклонение; CV – коэффициент вариации.

Таблица 5 – Результаты оценки селективности методики

Биологический материал	AUC пика аналита (среднее значение)		Селективность, %	AUC пика IS (среднее значение)		Селективность, %
	Интактный образец	Образец НПКО		Интактный образец	Образец НПКО	
Плазма крови	204,00	2105,00	9,72	361,50	374 333,33	0,10
Гомогенат мозга	188,83	2333,00	8,19	420,17	372 166,67	0,11
Гомогенат сердца	188,17	2308,33	8,32	820,83	365 166,67	0,22
Гомогенат аорты	190,33	2911,67	6,57	381,33	382 666,67	0,10
Гомогенат легких	221,00	2085,00	10,58	545,33	391 500,00	0,14

Примечание: AUC – площадь под кривой хроматографического пика, IS – внутренний стандарт, НПКО – нижний предел количественного определения.

Таблица 6 – Результаты оценки точности и прецизионности методики

Образец	НПКО 0,1 нмоль/мл	НК 8,0 нмоль/мл	СК 40,0 нмоль/мл	ВК 80,0 нмоль/мл
Точность и прецизионность, серия 1				
Измеренная концентрация, нмоль/мл	0,104±0,010	8,67±0,33	38,1±1,0	83,9±2,1
Точность, %	104,0	108,4	95,2	104,9
CV, %	9,90	3,84	2,52	2,48
Точность и прецизионность, серия 2				
Измеренная концентрация, нмоль/мл	0,093±0,009	8,33±0,05	38,1±0,9	82,9±1,5
Точность, %	93,4	104,1	95,2	103,7
CV, %	9,41	0,61	2,31	1,84
Точность и прецизионность, серия 3				
Измеренная концентрация, нмоль/мл	0,092±0,008	8,63±0,29	38,0±1,5	84,6±2,7
Точность, %	91,8	104,5	95,1	105,8
CV, %	9,13	3,42	3,84	3,22
Межсерийная точность и прецизионность				
Измеренная концентрация, нмоль/мл	0,096±0,010	8,45±0,29	38,1±1,0	83,8±2,1
Точность, %	96,4	105,7	95,1	104,8
CV, %	10,57	3,38	2,75	2,54

Примечание: НПКО – нижний предел количественного определения; НК – низкая концентрация; СК – средняя концентрация; ВК – высокая концентрация.

Таблица 7 – Содержание оксида азота в гомогенатах в пересчете на нитрит

Образец	Плазма крови	Головной мозг	Сердце	Аорта	Легкие
Содержание оксида азота, нмоль/мл	31,8±3,0	122,4±29,5	108,9±14,5	87,9±17,4	35,2±9,4

Результаты оценки пост-препаративной стабильности подтвердили сохранность готовых для хроматографического анализа проб в течение суток (максимальное время анализа всех образцов, находящихся в автосамплере хроматографа). Результаты исследования биологических образцов после 3-х циклов заморозки-разморозки показали высокие значения стабильности продуктов метаболизма NO. Так, площади хроматографических пиков продукта дериватизации нитритов до и после проведенной процедуры не отличались более, чем на 10%. Хранение гомогенатов тканей крыс в течение 3-х мес при температуре –40°C не приводило к существенному снижению NO. Так, площади хроматографических пиков одних и тех же образцов, проанализированных через 1 сут и 3 мес после получения биоматериала, не отличались более чем на 15%.

Для подтверждения возможности использования методики для количественной оценки содержания метаболитов NO, значительно превышающего верхний предел количественного определения (100 нмоль/мл в пересчете на нитрит), был валидирован 10-кратный фактор разбавления. Было установлено, что 10-кратное разбавление водой

стандартных растворов нитрита (1000 и 5000 нмоль/мл), приготовленных на гомогенатах тканей, не снижает точность и прецизионность анализа.

Разработанная методика была использована для анализа содержания метаболитов NO в тканях интактных крыс линии Wistar ($n=6$), содержащихся в виварии ФГБОУ ВО «Тверской государственный медицинский университет» Минздрава России и выведенных из эксперимента в утренние часы путем декапитации. Результаты определения NO представлены в таблице 7.

Разработанную методику также возможно использовать без осуществления стадии восстановления нитратов. В данном случае измерение уровня нитритов может играть важную роль, например, при исследовании механизмов цитопротекции в условиях гипоксии на модели ишемии-реперфузии [24]. Кроме того, оценка уровня нитритов может быть полезна при изучении процессов репликации вирусов, например, SARS-CoV-2 [25]. Применение данной методики совместно с определением уровня циклического гуанозинмонофосфата [26] в тканях лабораторных крыс может служить полезным инструментом в исследованиях не только физиологических

и патологических процессов, протекающих с участием NO [28–31], но и фармакодинамики лекарственных кандидатов, что является крайне важным этапом разработки лекарственных средств [32–34].

Ограничения исследования

По мнению авторов на достоверность результатов анализа могут повлиять следующие факторы: снижение активности нитратредуктазы и β-никотинамидаденинадинуклеотида, являющееся следствием неправильного хранения лиофилизатов или готовых растворов, наличие в биоматериале сульфаниламидных препаратов, а также поступление нитратов и нитритов в организм лабораторных животных при несоблюдении требований к кормлению.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Данное исследование было выполнено в рамках государственного задания, номер госрегистрации – 124020900020-4.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Все авторы сделали эквивалентный и равнозначный вклад в подготовку публикации. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией). Н.С. Попов – идея использования ВЭЖХ-МС/МС для количественного определения оксида азота, разработка, валидация и апробация биоаналитической методики, подготовка рукописи; Д.А. Гавриленко – анализ литературных источников, проведение биологической части исследования, анализ результатов, подготовка рукописи; М.С. Баранов – разработка концепции исследования, подготовка рукописи; В.Ю. Балабаньян – постановка цели, разработка дизайна исследования, подготовка рукописи.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Ignarro L.J. Nitric oxide is not just blowing in the wind // *Br J Pharmacol.* – 2019. – Vol. 176, No. 2. – P. 131. DOI: 10.1111/bph.14540
2. Lundberg J.O., Weitzberg E. Nitric oxide signaling in health and disease // *Cell.* – 2022. – Vol. 185, No. 16. – P. 2853–2878. DOI: 10.1016/j.cell.2022.06.010
3. Zweier J.L., Ilangovan G. Regulation of nitric oxide metabolism and vascular tone by cytoglobin // *Antioxid Redox Signal.* – 2020. – Vol. 32, No. 16. – P. 1172–1187. DOI: 10.1089/ars.2019.7881
4. Gupta R.M., Libby P., Barton M. Linking regulation of nitric oxide to endothelin-1: The Yin and Yang of vascular tone in the atherosclerotic plaque // *Atherosclerosis.* – 2020. – Vol. 292. – P. 201–203. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2019.11.001
5. Enayati M., Schneider K.H., Almeria C., Grasl C., Kaun C., Messner B., Rohringer S., Walter I., Wojta J., Budinsky L., Walpoth B.H., Schima H., Kager G., Hallström S., Podesser B.K., Bergmeister H. S-nitroso human serum albumin as a nitric oxide donor in drug-eluting vascular grafts: Biofunctionality and preclinical evaluation // *Acta Biomater.* – 2021. – Vol. 134. – P. 276–288. DOI: 10.1016/j.actbio.2021.07.048
6. Shvetsova A.A., Borzykh A.A., Selivanova E.K., Kiryukhina O.O., Gaynullina D.K., Tarasova O.S. Intrauterine Nitric Oxide Deficiency Weakens Differentiation of Vascular Smooth Muscle in Newborn Rats // *Int J Mol Sci.* – 2021. – Vol. 22, No. 15. – P. 8003. DOI: 10.3390/ijms22158003
7. Grigorieva M.E., Myasoedov N.F., Lyapina L.A. Participation of Nitric Oxide in the Realization of Hemostatic Effects of Glyproline Peptides // *Dokl Biochem Biophys.* 2022. – Vol. 506, No. 1. – P. 177–180. DOI: 10.1134/S1607672922050052
8. Norooznezhad A.H., Mansouri K. Endothelial cell dysfunction, coagulation, and angiogenesis in coronavirus disease 2019 (COVID-19) // *Microvasc Res.* – 2021. – Vol. 137. – P. 104188. DOI: 10.1016/j.mvr.2021.104188
9. Wallace J.L. Nitric oxide in the gastrointestinal tract: opportunities for drug development // *Br J Pharmacol.* – 2019. – Vol. 176, No. 2. – P. 147–154. DOI: 10.1111/bph.14527
10. Sanders K.M., Ward S.M. Nitric oxide and its role as a non-adrenergic, non-cholinergic inhibitory neurotransmitter in the gastrointestinal tract // *Br J Pharmacol.* – 2019. – Vol. 176, No. 2. – P. 212–227. DOI: 10.1111/bph.14459
11. Tripathi M.K., Kartawy M., Amal H. The role of nitric oxide in brain disorders: Autism spectrum disorder and other psychiatric, neurological, and neurodegenerative disorders // *Redox Biol.* – 2020. – Vol. 34. – P. 101567. DOI: 10.1016/j.redox.2020.101567

12. Ghasemi M., Mayasi Y., Hannoun A., Eslami S.M., Carandang R. Nitric oxide and mitochondrial function in neurological diseases // *Neuroscience*. – 2018. – Т. 376. – P. 48–71. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2018.02.017
13. Tewari D., Sah A.N., Bawari S., Nabavi S.F., Dehpour A.R., Shirooie S., Nabavi S.M. Role of nitric oxide in neurodegeneration: function, regulation, and inhibition // *Curr Neuropsychopharmacol*. – 2021. – Vol. 19, No. 2. – P. 114–126. DOI: 10.2174/1570159X18666200429001549
14. Green S.J. Covid-19 accelerates endothelial dysfunction and nitric oxide deficiency // *Microbes Infect*. – 2020. – Vol. 22, No. 4. – P. 149. DOI: 10.1016/j.micinf.2020.05.006
15. Xu S., Ilyas I., Little P.J., Li H., Kamato D., Zheng X., Weng J. Endothelial dysfunction in atherosclerotic cardiovascular diseases and beyond: from mechanism to pharmacotherapies // *Pharmacological Reviews*. – 2021. – Vol. 73, No. 3. – P. 924–967. DOI: 10.1124/pharmrev.120.000096
16. Cetin M., Erdogan T., Kiris T., Ozyildiz A.G., Ergul E., Durakoglugil E., Cicek Y. Endothelial dysfunction, subclinical atherosclerosis and LDL cholesterol are the independent predictors of left atrial functions in hypertension // *Int J Cardiovasc Imaging*. – 2020. – Vol. 36, No. 1. – P. 69–77. DOI: 10.1007/s10554-019-01699-2
17. Feelisch M. The use of nitric oxide donors in pharmacological studies // *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. – 1998. – Vol. 358, No. 1. – P. 113–122. DOI: 10.1007/PL00005231
18. Sun J., Zhang X., Broderick M., Fein H. Measurement of nitric oxide production in biological systems by using Griess reaction assay // *Sensors*. – 2003. – Vol. 3, No. 8. – P. 276–284. DOI: 10.3390/s30800276
19. Ricart-Jane D., Llobera M., Lopez-Tejero M.D. Anticoagulants and other preanalytical factors interfere in plasma nitrate/nitrite quantification by the Griess method // *Nitric Oxide*. – 2002. – Vol. 6, No. 2. – P. 178–185. DOI: 10.1006/niox.2001.0392
20. Yucel A.A., Gulen S., Dincer S., Yucel A.E., Yetkin G.I. Comparison of two different applications of the Griess method for nitric oxide measurement // *J Exp Integr Med*. – 2012. – Vol. 2, No. 1. – P. 167. DOI: 10.5455/jeim.200312.or.024
21. Hunter R.A., Storm W. L., Coneski P.N., Schoenfish M.H. Inaccuracies of nitric oxide measurement methods in biological media // *Analytical chemistry*. – 2013. – Vol. 85, No. 3. – P. 1957–1963. DOI: 10.1021/ac303787p
22. Aziz H.A., Moustafa G.A.I., Abbas S.H., Derayea S.M., Abuo G.E.D.A.A. New norfloxacin/nitric oxide donor hybrids: Synthesis and nitric oxide release measurement using a modified Griess colorimetric method // *Eur J Chem*. – 2017. – Vol. 8, No. 2. – P. 119–124. DOI: 10.5155/eujchem.8.2.119-124.1549
23. Minkler P., Stoll M., Ingalls S., Yang S., Kerner J., Hoppel C.L. Quantification of carnitine and acylcarnitines in biological matrices by HPLC electrospray ionization–mass spectrometry // *Clin Chem*. – 2008. – Vol. 54. – P. 1451–1462. DOI: 10.1373/clinchem.2007.099226
24. Гуманова Н.Г. Оксид азота, его циркулирующие метаболиты NOx и их роль в функционировании человеческого организма и прогнозе риска сердечно-сосудистой смерти (часть I) // *Профилактическая медицина*. – 2021. – Т. 24, № 9. – С. 119–125. DOI: 10.17116/profmed202124091102
25. Fang W., Jiang J., Su L., Shu T., Liu H., Lai S., Wang J. The role of NO in COVID-19 and potential therapeutic strategies // *Free Radic Biol Med*. – 2021. – Vol. 163. – P. 153–162. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.12.008
26. Попов Н.С., Балабаньян В.Ю., Колгина Н.Ю., Петров Г.А., Донсков С.А., Атаджанов И.Б. Количественное определение циклического гуанозинмонофосфата (ц-ГМФ) в тканях крыс с помощью жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. – 2023. – № 3. – С. 28–38. DOI: 10.37489/2587-7836-2023-3-28-38
27. Infante T., Costa D., Napoli C. Novel insights regarding nitric oxide and cardiovascular diseases // *Angiology*. – 2021. – Vol. 72, No. 5. – P. 411–425. DOI: 10.1177/00033197209792
28. Idrizaj E., Traini C., Vannucchi M.G., Baccari M.C. Nitric oxide: from gastric motility to gastric dysmotility // *Int J Mol Sci*. – 2021. – Vol. 22, No. 18. – P. 9990. DOI: 10.3390/ijms22189990
29. Yaguchi J., Yaguchi S. Evolution of nitric oxide regulation of gut function // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2019. – Vol. 116, No. 12. – P. 5607–5612. DOI: 10.1073/pnas.1816973116
30. Morales-Medina J.C., Aguilar-Alonso P., Di Cerbo A., Iannitti T., Flores G. New insights on nitric oxide: Focus on animal models of schizophrenia // *Behavioural Brain Research*. – 2021. – Vol. 409. – P. 113304. DOI: 10.1016/j.bbr.2021.113304
31. Cyr A.R., Huckaby L.V., Shiva S.S., Zuckerbraun B.S. Nitric oxide and endothelial dysfunction // *Crit Care Clin*. – 2020. – Vol. 36, No. 2. – P. 307–321. DOI: 10.1016/j.ccc.2019.12.009
32. AbdelAziz E.Y., Tadros M.G., Menze E.T. The effect of metformin on indomethacin-induced gastric ulcer: Involvement of nitric oxide/Rho kinase pathway // *Eur J Pharmacol*. – 2021. – Vol. 892. – P. 173812. DOI: 10.1016/j.ejphar.2020.173812
33. Cieřlik P., Kalinowski L., Wierońska J.M. Pro-cognitive activity of nitric oxide inhibitors and donors in animal models // *Nitric Oxide*. – 2022. – Vol. 119. – P. 29–40. DOI: 10.1016/j.niox.2021.12.003
34. Yuyun M.F., Ng L.L., Ng G.A. Endothelial dysfunction, endothelial nitric oxide bioavailability, tetrahydrobiopterin, and 5-methyltetrahydrofolate in cardiovascular disease. Where are we with therapy? // *Microvasc Res*. – 2018. – Vol. 119. – P. 7–12. DOI: 10.1016/j.mvr.2018.03.012

АВТОРЫ

Попов Никита Сергеевич – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармакологии и клинической фармакологии, заведующий научно-исследовательской лабораторией, ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-1792-7414. E-mail: ns.popov@mail.ru

Гавриленко Дмитрий Антонович – ассистент кафедры химии ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0009-0003-8692-0878. E-mail: dimirdome@gmail.com

Баранов Михаил Сергеевич – доктор химических наук, старший научный сотрудник

научно-исследовательской лаборатории химии лекарственных субстанций НИИ трансляционной медицины, ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-9339-7603. E-mail: baranovmikes@gmail.com

Балабаньян Вадим Юрьевич – доктор фармацевтических наук, доцент, ведущий научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории химии лекарственных субстанций НИИ трансляционной медицины, ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-5744-7060. E-mail: bal.pharm@mail.ru