

ПОНИЖЕННАЯ БИОДОСТУПНОСТЬ ОКСИДА АЗОТА У ЛОШАДЕЙ С СИМПТОМОКОМПЛЕКСОМ КОЛИК: ОЦЕНКА МЕТОДОМ ЭПР-СПЕКТРОСКОПИИ

© 2020 г. В.А. Сереженков*, Н.А. Ткачев*, З.С. Артюшина**,
М.И. Кузнецова**, М. Ковач***, А.Ф. Ванин*

*Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН, 119334, Москва, ул. Косыгина, 4

**Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина,
109472, Москва, ул. Академика Скрябина, 23

***Ветеринарная клиника КСК «Новый Век»,
143421, Красногорск Московской области, д. Поздняково, ул. Животноводов, вл. 1

E-mail: serezhenkov@yandex.ru

Поступила в редакцию 17.02.2020 г.

После доработки 17.02.2020 г.

Принята к публикации 25.05.2020 г.

Патогенез заболеваний пищеварительного тракта лошадей, сопровождающихся развитием воспаления и окислительного стресса, может быть связан с недостатком монооксида азота, который контролирует различные сигнальные пути в организме. В работе проведено определение уровня нитритов, метаболитов оксида азота, у лошадей с различными кишечными заболеваниями. Концентрация нитрита в сыворотке крови у лошадей возрастной группы 7–26 лет составила 3.60 ± 3.02 мкМ, а у молодых животных (1–5 лет) – 8.3 ± 6.0 мкМ. Резкое снижение нитрита было отмечено у всех лошадей с кишечными заболеваниями (3.39 ± 2.85 мкМ), особенно при метеоризме (0.6 ± 0.4 мкМ) и закупорке ободочной кишки (0.81 ± 0.5 мкМ).

Ключевые слова: лошадь, ЭПР-спектроскопия, нитрит, оксид азота, динитрозильные комплексы железа, нитрозогемоглобин.

DOI: 10.31857/S0006302920050208

Распространенность заболеваний желудка и кишечника у лошадей [1, 2], многофакторный характер их патогенеза, а также сложность дифференциальной диагностики требуют дальнейшего изучения, обуславливая высокую практическую и теоретическую значимость этой проблемы.

Одной из основных характеристик желудочно-кишечных заболеваний у лошадей является частое развитие эндотоксического шока. Практически все заболевания кишечника лошади вызывают изменение состава и количественных соотношений ее микрофлоры, снижение рН содержимого кишечника. Как правило, эндотоксины грамотрицательных бактерий, всасываемые стенкой кишечника, связываются со специфическими рецепторами CD14 на эндотелиальных клетках кровеносных сосудов, дендритных клетках, моноцитах и макрофагах. Через рецепторы

CD14 эндотоксины связываются с Toll-подобными рецепторами (TLR2, TLR4) и митоген-активируемыми киназами [3, 4], что вызывает развитие воспалительного ответа.

В этой связи важную роль в метаболизме нитросоединений (нитритов, нитратов и NO) при развитии заболеваний кишечника принадлежит не только патогенной, а всей микрофлоре кишечника [5–7]. Мембранные липополисахариды бактерий и цитокины служат индукторами индуцируемой NO-синтазы; возрастание продукции NO при заболеваниях желудочно-кишечного тракта показано в многочисленных исследованиях [8–11]. NO в высоких концентрациях может оказывать токсическое действие, вызывая апоптоз и некроз энтероцитов, нарушение кишечного барьера, что способствует бактериальной транслокации, снижению моторики и возникновению диареи [12]. Вместе с тем при воспалении NO может оказывать защитное действие: стимулировать кровоток в стенке кишечника, усиливать секрецию слизи, способствовать возрастанию антибактериального ответа [13].

Сокращения: ДНКЖ – динитрозильные комплексы железа, ЭПР – электронный парамагнитный резонанс, МГД – N-метил-D,L-глюкаминдигидрокарбамат, МНКЖ – мононитрозильные комплексы железа.

Иными словами, заболевания желудочно-кишечного аппарата лошадей имеют острый характер течения, и в результате гиперпродукции активных форм кислорода [14, 15] уровень NO, необходимый для нормального функционирования эндотелия сосудов слизистой оболочки кишечника и сфинктеров, может снижаться.

Особые физико-химические свойства NO определяют способ его транспортировки: в форме нитрозильных комплексов с гемовым железом, нитрозотиолов [16, 17], а также высокомолекулярных комплексов негемового железа с тиольными лигандами (глутатион, цистеин) — так называемых «комплексов 2.03» [18, 19]. Образование динитрозильных комплексов (ДНКЖ) при связывании тиоловых групп железа (II) с NO и нитрозотиолов на белках представляет собой форму посттрансляционной регуляции их активности [18–20]. Такой способ модификации белка является селективным, обратимым и стабилизирует NO в уникальной биологически активной форме. Источником железа для синтеза ДНКЖ служит нетрансферринсвязанное железо, в транспорте которого важная роль принадлежит альбумину, трансферрину крови и белкам клеток кишечника, ответственным за его всасывание.

Измерение концентрации нитратов и нитритов — $(NO)_x$ — с использованием реактива Грисса традиционно применяется для количественной оценки тяжести воспалительного процесса [16]. В литературе также имеются данные об измерении концентрации нитрозотиолов [21–23]. Из-за методологических трудностей данные об уровне нитрозотиолов в норме и при воспалительных состояниях часто варьируют в широком диапазоне: от 1 нМ до 7 мкМ [24]. В работах [25, 26] определяли по методу Грисса нитриты и нитраты в сыворотке крови лошадей при заболеваниях желудочно-кишечного тракта. Несмотря на очевидные клинические показатели желудочно-кишечных заболеваний у животных, оценка общего уровня нитратов и нитритов [27] не позволила дифференцировать норму от патологии даже в случае исследования больших выборок животных. В литературе утвердилась точка зрения, что как в норме, так и при патологии желудочно-кишечного тракта измерение метаболита NO — нитрита [28] — является наиболее правильной оценкой его уровня в организме. Ранее нами была исследована группа лошадей разных пород и возраста, в том числе восемь животных с заболеваниями желудочно-кишечного тракта. В данной работе мы дополнили наши исследования животных с патологией.

Целью работы, основанной на анализе литературных данных о возможной связи уровней оксида азота, было измерение уровня метаболита NO — нитрита — в сыворотке крови методом спектроскопии электронного парамагнитного резонанса

(ЭПР) с использованием спиновых ловушек [29, 30] одновременно с измерением нитрозогемоглобина и трансферрина в крови лошадей с симптомами колик и патологии желудочно-кишечного тракта в целом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлись лошади в количестве 62 животных, в том числе пород ганновер-голландской, орлово-терской, ахалтекинской; при клиническом исследовании у десяти из них были диагностированы: катаральный спазм, закупорка толстой кишки, колит, смещение толстой кишки, метеоризм.

NO образует с гемоглобином стабильные комплексы железа, что позволяет определять его непосредственно в образцах крови методом ЭПР. Для определения в сыворотке крови метаболита NO — нитрита — мы использовали метод спиновой ловушки, основанный на использовании дитиокарбамата и железа (II).

Для исследования кровь брали из яремной вены в гепариновые пробирки и центрифугировали в течение 10 мин на центрифуге модели СH80-2S (ООО НПЦ МТ «АРМЕД», Балашиха Московской области) со скоростью 3000 об/мин для осаждения эритроцитов. После этого образцы сыворотки хранили в жидком азоте (-196°C). Для измерения концентрации нитрозогемоглобина цельную кровь (без гепарина) замораживали в пластиковых контейнерах цилиндрической формы длиной 35 мм и диаметром 4 мм. Сигналы ЭПР регистрировали на спектрометре Bruker ECS-106 (Германия).

Синтез ДНКЖ с глутатионом проводили согласно ранее опубликованной работе [18].

Метод определения NO, использованный в данной работе, основан на реакции образования нитрозотиола — нитрозоцистеина — в кислой среде (рН 3.5) из нитрит-аниона NO_2^- и гидрохлорида цистеина. Затем нитрозоцистеин в присутствии железа (2+) и N-метил-D,L-глукаминдитиокарбамата (МГД) образует водорастворимый парамагнитный моонитрозильный комплекс железа (МНКЖ) — МГД-Fe-NO. Определение нитрит-аниона (NO_2^-) осуществляли следующим образом: сывороточные белки с массой более 30 кДа после размораживания удаляли фильтрованием через фильтр Microcon 30 кДа (Millipore Corp., США) в течение 20 мин при 14500 об/мин в мини-центрифуге «Спин плюс» (Эппендорф, Австрия). Разработанный метод позволяет, во-первых, контролировать влияние сывороточных белков на реакцию образования МНКЖ МГД, во-вторых, учесть вклад высокомолекулярных нитрозотиолов [17] и ДНКЖ [18] в

качестве источников NO. К 50 мкл цистеина в концентрации 400 мМ после фильтрации добавляли 10–120 мкл сыворотки, pH раствора доводили до 3.5 путем добавления 0.01 мМ HCl. Через 5 мин добавляли 50 мкл 40 мМ сульфата железа (II), 200 мкл 400 мМ буфера (трис или HEPES) и 200 мкл МГД с концентрацией 250 мМ. Затем pH раствора повысили до 7.6 с помощью 0.06% раствора NaOH. В этих условиях образуется МНКЖ МГД-Fe-NO.

Анализ данных. Для построения калибровочной кривой различные объемы (2–40 мкл) раствора нитрита натрия с концентрацией 480 мкМ добавляли к 50 мкл гидрохлорида цистеина с концентрацией 400 мМ, pH раствора доводили до 3.5, добавляя 0.01 мМ HCl. Через 5 мин добавляли 50 мкл 40 мМ сульфата железа, 200 мкл 200 мМ (трис или HEPES), 200 мкл 250 мМ МГД, pH доводили до 7.6 с помощью 0.06% раствора NaOH. Через 10 мин регистрировали спектр ЭПР МНКЖ МГД-Fe-NO. Концентрацию нитрита в образце оценивали методом двойного интегрирования и построения калибровочной кривой (рис. 1). Для оценки степени различия использовали анализ формы распределения (критерий Колмогорова–Смирнова) и сравнение медиан и средних (критерий Манна–Уитни и критерий Стьюдента соответственно).

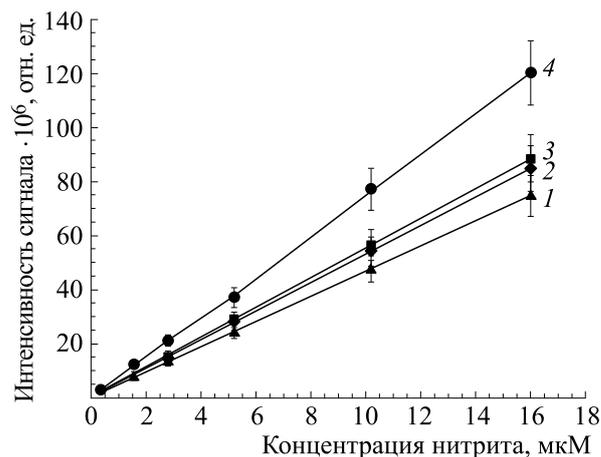


Рис. 1. Зависимости интенсивности сигнала ЭПР от концентрации нитрита в диапазоне 0.3–16 мкМ в образце в присутствии (кривые 1–3) и после удаления сывороточных белков (кривая 4).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Используя построенную калибровочную кривую (рис. 1), мы измерили содержание нитритов в образцах сыворотки крови животных (табл. 1). Оценку проводили после исследования влияния сывороточных белков, которые вносят существенный вклад в вариабельность данных. Также на рис. 1 можно видеть, что калибровочная кривая в присутствии белков отличается от той, где

Таблица 1. Результаты измерения нитрозогемоглобина в цельной крови и нитритов в сыворотке крови лошадей

№	Характеристика животных	Концентрация нитрозогемоглобина, мкМ	Концентрация нитрита, мкМ
1	Здоровые лошади; возраст от 1 года до 6 лет, <i>n</i> = 8	0.1 ± 0.1	min 0.74 ± 0.4 max 16.8 ± 0.6
2	Здоровые лошади; возраст от 7 до 26 лет, <i>n</i> = 14	0.14 ± 0.1	min 0.35 ± 0.3 max 14.9 ± 0.5
3	Закупорка большой ободочной кишки; 13.5 года	–	2.38 ± 0.70
4	Метеоризм; 7 лет	–	0.60 ± 0.40
5	Закупорка слепой кишки; 14 лет	–	2.41 ± 0.70
6	Резекция после заворота; 12 лет	0.1 ± 0.1	3.45 ± 1.20
7	Резекция после заворота; 9 лет	0.1 ± 0.1	1.36 ± 0.4
8	Закупорка большой ободочной кишки, легкое перемещение; 26 лет	–	0.81 ± 0.50
9	Хронические колики; 3.5 года	0.69 ± 0.30	2.30 ± 0.60
10	Колит (периодами); 15 лет	0.1 ± 0.1	3.8 ± 1.80
11	Колиты, редко; 8 лет	–	11.4 ± 4.2
12	Колит; 2 года	0.4 ± 0.1	7.2 ± 2.4

Примечание. Данные представлены в виде $M \pm m$.

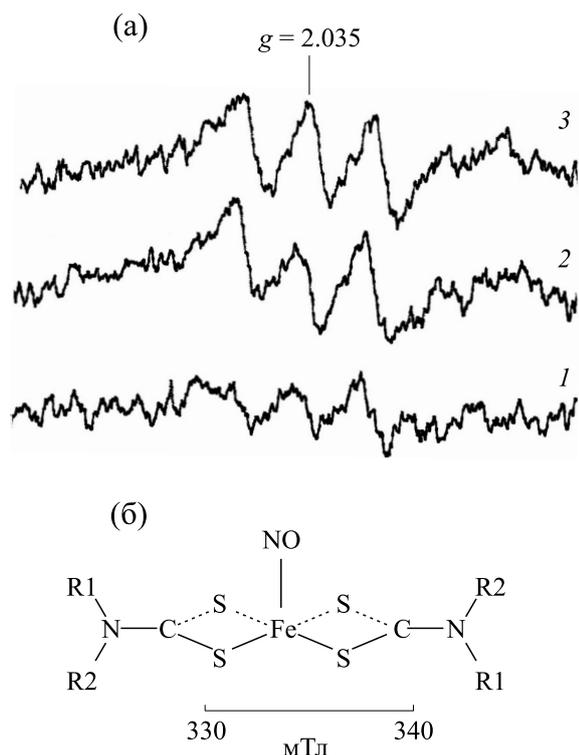


Рис. 2. (а) – Спектры ЭПР комплекса N-метил-D,L-глюкозамин дитиокарбамата с железом (2+) и оксидом азота МНКЖ (комплекс МГД-Fe-NO) в сыворотке крови больных лошадей: 1 – метеоризм, 2 – закупорка большой ободочной кишки, 3 – закупорка слепой кишки. Условия записи спектров: X-диапазон, центр поля 334 мТл, развертка 10 мТл, амплитуда модуляции 5 Гс, мощность СВЧ 20 мВт. Усиление $1 \cdot 10^5$, 1 скан, $T = 290$ К. (б) – Структурная формула парамагнитного комплекса МГД-Fe-NO (R1 и R2 – N-метил-D,L-глюкозамин).

белки удалены фильтрацией, тангенс угла наклона у нее ниже. На рис. 2 показаны хорошо выраженные спектры ЭПР МНКЖ МГД-Fe-NO с $g = 2.035$ сыворотки крови животных с желудочно-кишечными заболеваниями. На рис. 3 представлен спектр нитрозогемоглобина с $g = 2.07$ и $g = 1.98$ при 77 К крови больной лошади и спектр крови, обработанной оксидом азота, где по величине сверхтонкой структуры 17 Гс можно четко идентифицировать комплекс «гемоглобин-NO». Это является строгим критерием его наличия.

В табл. 1 приведены результаты измерений нитритов в сыворотке крови здоровых животных двух возрастных групп: 1–6 и 7–26 лет, а также десяти животных с патологией (данные остальных восьми животных были приведены ранее). Результаты статистического анализа полученных данных приведены в табл. 2 и на рис. 4. Статистический анализ показал существенные отличия по изученным параметрам возрастных и заболевших лошадей от молодых ($p = 0.0484$ и 0.0108 ; 0.0587 и

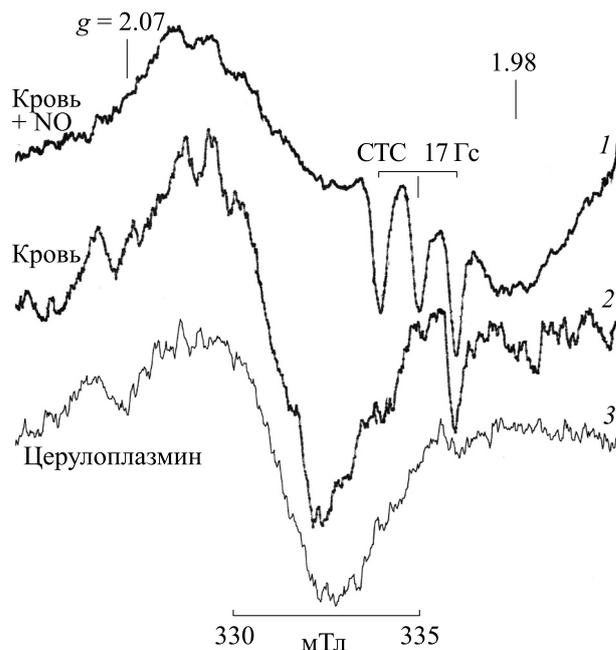


Рис. 3. Спектры ЭПР крови здоровой лошади (спектр 2), крови, обработанной газообразным оксидом азота (спектр 1), и церулоплазмину (спектр 3). Кровь здоровой лошади содержит нитрозогемоглобин в количестве 0.2 ± 0.5 мкМ; кровь, обработанная оксидом азота, – $12,3 \pm 0,3$ мкМ. Условия регистрации, как указано выше. Спектр 1: усиление $2 \cdot 10^5$, 4 скана; спектр 2 – $1 \cdot 10^5$, 1 скан. $T = 77$ К.

$0,0831$), тогда как отличия по медиане между возрастными и заболевшими мало значимы ($p = 0.3340$ и 0.0216). Эти результаты согласуются с ранее полученными нами данными.

На рис. 5 показаны спектры ЭПР трансферрина крови здоровой лошади шестилетнего возраста (спектр 1) и крови с добавлением 20 мкМ Fe^{3+} (спектр 2), а также трех животных с метеоризмом (спектр 3), закупоркой слепой кишки (спектр 4) и с закупоркой большой ободочной кишки (спектр 5). Форма ЭПР сигнала трансферрина лошадей с патологией отличается от нормы, что, по-видимому, обусловлено вкладом нетрансферринсвязанного железа крови. Нельзя исключить и возможность замены аминокислоты в активном центре связывания железа, что приводит к снижению константы связывания железа трансферрином и накоплению свободного железа. Обмен железа у лошадей отличается тем, что после интенсивных нагрузок его уровень в крови сильно колеблется, что обусловлено гемолизом эритроцитов, в том числе легочными геморрагиями. Анализ спектров ЭПР трансферрина здоровых животных в нашей выборке свидетельствует о его низкой насыщенности железом (44–46%), что согласуется с литературными данными. В случае воспалительных процессов в организме лошади

Таблица 2. Статистический анализ полученных данных

	Группы лошадей		
	Молодые (1–6 лет)	Возрастные (7–26 лет)	Больные
Среднее \pm SD, мкМ	8.32 \pm 5.96	3.55 \pm 3.02	3.39 \pm 2.85
Медиана, мкМ	8.8	1.6	2.41
Нормальное распределение, тест Шапиро–Уилка, p	0.77	$6 \cdot 10^{-5}$	0.0021
	Молодые/возрастные	Молодые/больные	Возрастные/больные
Форма распределения, тест Колмогорова–Смирнова, p	0.0512	0.0831	0.0216
Медианы, U -тест Манна–Уитни, p	0.0156	0.0587	0.3340
Средние, t -тест Стьюдента, p	0.0194	0.0169	0.9791

также наблюдается снижение уровня железа и насыщенности трансферрина.

На рис. 6 приведен спектр ЭПР крови здоровой лошади, которой ввели ДНКЖ с глутатионом (1 : 10) в дозе 1700 мкг/кг. Концентрация комплекса с альбумином в крови соответствует 3.6 ± 0.5 мкМ. При комнатной температуре ЭПР-сигнал идентичен модельному комплексу ДНКЖ альбумина (спектр не приводится).

ОБСУЖДЕНИЕ

NO следует рассматривать как один из важнейших факторов защиты слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта. Сниженное образование NO влияет на секреторные и регенеративные функции желудка. В неадренергических/нехолинергических нейронах, которые наряду с холин- и норадренергическими проводниками

вегетативной нервной системы составляют третий тип автономной нервной системы, NO играет роль нейромедиатора [31–33]. Активность K^+ -каналов в проводящих импульсах в нейронах сильно зависит от степени нитрозилирования цистеиновых каналообразующего белка [15]. Нитрозилирование цистеинов в четырех из пяти фрагментов белка замедляет проведение импульсов в нейронах. У лошадей есть три автономных центра регуляции перистальтики, связанных с интерстици-

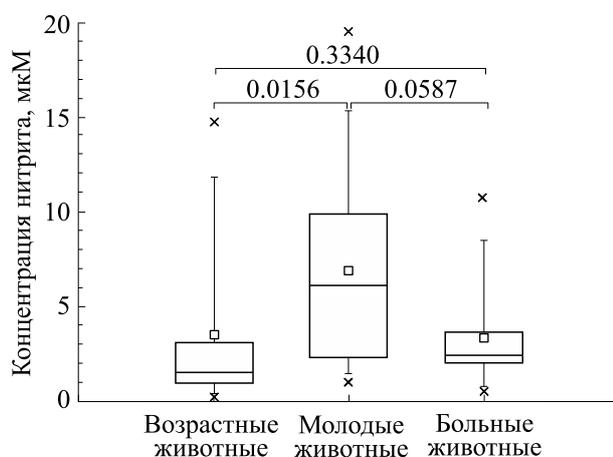


Рис. 4. Концентрация нитрита в сыворотке лошадей.

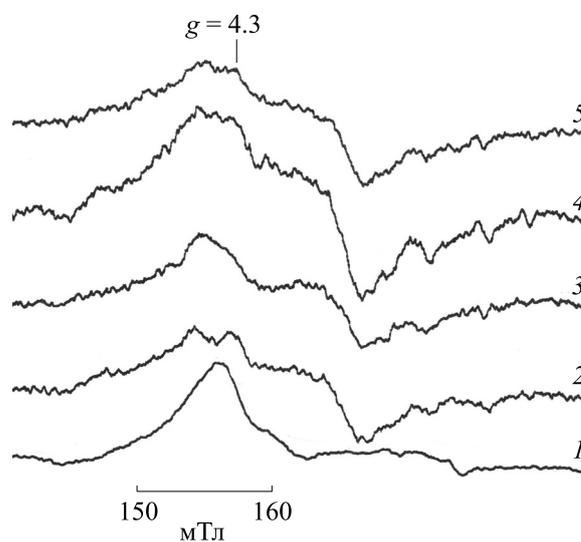


Рис. 5. Спектры ЭПР трансферрина крови: 1 – здоровая лошадь возраста 6 лет; 2 – то же, с добавлением 20 мкМ Fe^{3+} ; 3 – метеоризм; 4 – закупорка слепой кишки; 5 – закупорка большой ободочной кишки. Условия записи спектров: X-диапазон, центр поля 160 мТл, развертка 60 мТл, амплитуда модуляции 5 Гс, мощность СВЧ 20 мВт. Усиление $1 \cdot 10^5$, 1 скан, $T = 77$ К.

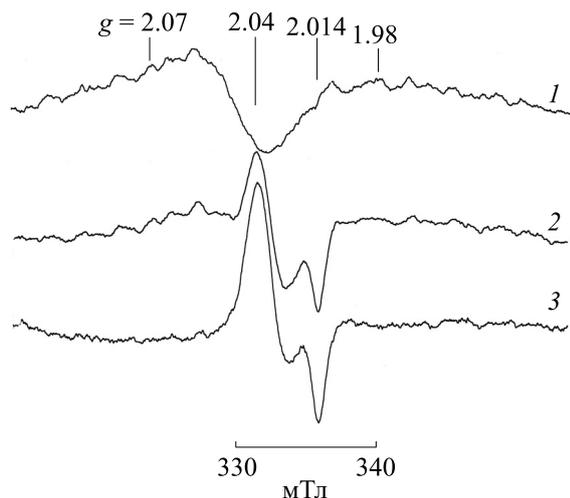


Рис. 6. 1 – Спектр ЭПР крови здоровой лошади до введения ДНКЖ (гемоглобин + церулоплазмин); 2 – после введения экзогенного ДНКЖ с глутатионом (1 : 10); 3 – разность спектров 2 и 1. Условия записи спектров: X-диапазон, центр поля 336 мТл, развертка 40 мТл, амплитуда модуляции 5 Гс, мощность СВЧ 20 мВт. Усиление $1 \cdot 10^5$, 4 скана, $T = 77$ К.

альными клетками Кахалы: гастродуоденальный центр, илео-целиакальный центр и центр тазового изгиба [34–36]. В дополнение к NO вегетативная нервная система кишечника использует в качестве нейромедиаторов вазоактивный кишечный пептид и субстанцию P [35, 37]. Участие NO в патологических процессах, происходящих в толстой кишке, было показано в работах [6, 38]. В частности, экспериментальный колит сопровождается снижением экспрессии нейрональной NO-синтазы и нарушением релаксации толстой кишки. Эти изменения могут способствовать нарушению моторики и кишечной абсорбции. По последним данным, повышенный общий уровень $(NO)_x$ характеризует течение воспалительных процессов в организме в результате повышенной активности индуцируемой NO-синтазы. Хорошо известно, что в этом случае развивается окислительный стресс в клетках и тканях, процессы инициируются с участием активных форм кислорода [39, 40]. В результате эффективный NO превращается в активные формы азота ($NOCl$, $OO-NO^-$ и др.) и нитраты. Из измерений методом масс-спектрометрии сыворотки крови человека авторы работы [24] установили, что при патологии уровень нитратов в сыворотке увеличивается, а уровень нитритов уменьшается по отношению к норме.

Для обоснования сниженного уровня NO при развитии окислительного стресса предложена концепция биодоступного NO. Иными словами, производится много NO, но его действие как медиатора недостаточно. На определенных стадиях

заболевания наблюдается дефицит NO, и, следовательно, сниженная биодоступность NO вызывает нарушение функций желудочно-кишечного тракта у лошадей. В работах [2, 41] метронидазол впервые применили для лечения лошадей и людей при желудочно-кишечных заболеваниях как противовоспалительное и снимающее болевой синдром средство. Мейсон и др. показали образование оксида азота из нитрогруппы метронидазола в присутствии железа и цистеина в виде комплексов МНКЖ и ДНКЖ [42]. Аналогичным эффектом обладает нестероидный противовоспалительный препарат NO-аспирин (NCX-4016), который выделяет NO [43]. Было показано ингибирование функции сфинктера Одди донором оксида азота S-нитрозоацетилцистеином [44]. Эксперименты на моделях колита грызунов показали положительный эффект нитратов жирных кислот [45]. В работе [46] были исследованы заживление язв и изменения в микроциркуляции, вызванные синтезом оксида азота NO-синтазами, вызванным препаратом ВНВ (benexate hydrochloride betadex). Таким образом, введение в организм источников оксида азота оказывало значительный терапевтический эффект для работы желудочно-кишечного тракта.

Полученные нами данные показывают, что концентрация нитритов (см. табл. 1 и рис. 2) в сыворотке лошадей возрастной группы 7–26 лет была в 2.4 раза выше, чем у молодых животных. Острое снижение нитрита наблюдалось у всех лошадей с кишечными заболеваниями, особенно с метеоризмом и спастическими коликами. Уровень нитрозогемоглобина (см. табл. 1 и рис. 3) ниже в цельной крови двух возрастных групп здоровых лошадей, чем у больных животных.

Как в норме, так и при заболеваниях основным механизмом удаления избытка NO является его превращение в оксигенированном геме гемоглобина в нитрат (рис. 7а). В то же время часть NO может реагировать с кислородом с образованием нитрита, но эта реакция очень медленная при их физиологических концентрациях. Одним из авторов настоящей работы был предложен иной механизм возникновения нитрита из NO^+ в процессе распада ДНКЖ (или биядерных ДНКЖ) [47, 48]. Превращение NO также может происходить при взаимодействии с супероксидным анион-радикалом, образующимся при воспалении, с образованием пероксинитрита [39], который при pH 7.4 разлагается с образованием как нитратов, так и нитритов. Таким образом, в состоянии воспаления и окислительного стресса пути метаболизма NO смещаются в сторону образования нитратов (рис. 7б). Также возможно, что NO частично расходуется как на образование ДНКЖ [49], так и на неконтролируемое нитрозилирование белковых тиолов, а также на образование нитротирозина в

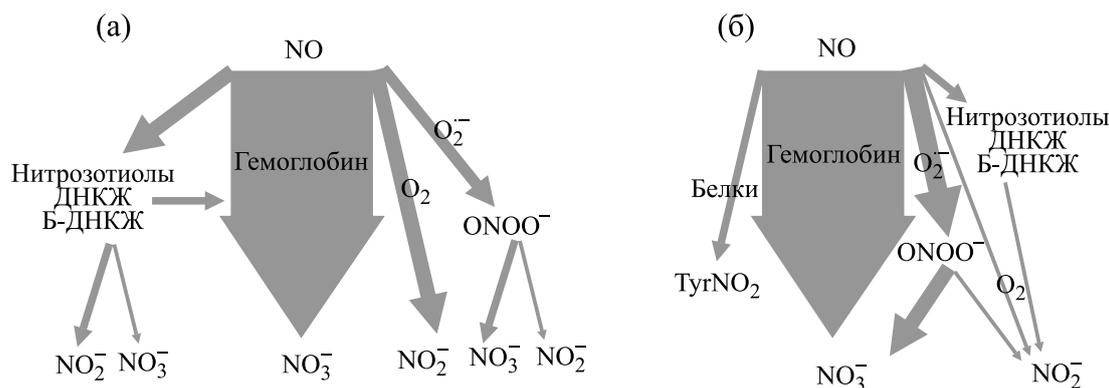


Рис. 7. Пути метаболизирования оксида азота: (а) – в норме, (б) – при окислительном стрессе.

белках [50], но вклад этого пути не так существен [51]. Нами не зарегистрированы значимые уровни ДНКЖ (или биядерных БДНКЖ) и нитрозотиолов в сыворотке как здоровых, так и больных животных, что согласуется с данными работ [52–54].

Мы полагаем, что эффективным средством восполнения оксида азота как экзогенного мессенджера и регулятора при заболеваниях желудочно-кишечного тракта у лошадей могут служить ДНКЖ (или биядерные БДНКЖ) с тиолатными лигандами.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Проведенные эксперименты полностью соответствуют действующим национальным и международным нормам в области этики.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. P. C. Barko, M. A. McMichael, K. S. Swanson, and D. A. Williams, *J. Vet. Intern. Med.* **32**, 9 (2018).
2. N. D. Cohen, *Equine Vet. Educ.* **14** (4), 212 (2002).
3. E. Lorenz, *Curr. Pharmaceut. Design* **12** (32), 4185 (2006).
4. H. Hug, M. H. Mohajeri, and G. La Fata, *Nutrients* **10**, 203 (2018).
5. J. Vermeiren, T. Van de Wiele, W. Verstraete, et al., *J. Biomed. Biotechnol.* **2009**, 284718 (2009).
6. J. O. Lundberg and E. Weitzberg, *Gut* **62** (4), 616 (2013).
7. F. A. Uzal and S. S. Diab, *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* **31**, 337 (2015).
8. D. Rachmilewitz, J. S. Stamler, D. Bachwich, et al., *Gut* **36** (5), 718 (1995).
9. M. Herulf, B. Svenungsson, A. Lagergren, et al., *J. Infect. Dis.* **180** (2), 542 (1999).
10. N. K. Chokshi, Y. S. Guner, C. J. Hunter, et al., *Semin. Perinatol.* **32** (2), 92 (2008).
11. R. E. Malmström, H. Björne, A. Oldner, et al., *Shock* **18** (5), 456 (2002).
12. M. B. Grisham, K. P. Pavlick, F. S. Laroux, et al., *J. Invest. Med.* **50** (4), 272 (2002).
13. D. M. McCafferty, J. S. Mudgett, M. G. Swain, and P. Kubes, *Gastroenterology* **112** (3), 1022 (1997).
14. H. M. M. Ibrahim, *J. Equine Vet. Sci.* **34** (10), 1205 (2014).
15. N. Gamper and L. Ooi, *Antioxid. Redox Signal.* **22** (6), 486 (2015).
16. J. S. Stamler, O. Jaraki, J. Osborne, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89** (16), 7674 (1992).
17. D. T. Hess, A. Matsumoto, S.-O. Kim, et al., *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 150 (2005).
18. A. F. Vanin, V. A. Serezhenkov, V. D. Mikoyan, and M. V. Genkin, *Nitric Oxide* **2** (4), 224 (1998).
19. V. P. Mokh, A. P. Poltorakov, V. A. Serezhenkov, and A. F. Vanin, *Nitric Oxide* **22** (4), 266 (2010).
20. В. А. Сerezhenkov, С. М. Борунова, М. И. Кузнецова и Н. А. Ткачев, *Дезинфекция. Антисептика* **5** (1), 50 (2014).
21. A. Gow and J. Stamler, *Nature* **391** (6663), 169 (1998).
22. S. A. Rocks, C. A. Davies, S. L. Hicks, et al., *Free Radic. Biol. Med.* **39** (7), 937 (2005).
23. P. H. MacArthur, S. Shiva, and M. T. Gladwin, *J. Chromatogr.* **851**, 93 (2007).
24. D. Tsikas, *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **851**, 51 (2007).
25. M. H. Mirza, J. L. Oliver, T. L. Seahorn, et al., *Can. J. Vet. Res.* **63** (4), 230 (1999).
26. N. Galvin, H. Dillon, and F. McGovern, *Irish Vet. J.* **57** (8), 467 (2004).
27. M. H. Mirza, T. L. Seahorn, J. L. Oliver, et al., *Can. J. Vet. Res.* **69**, 106 (2005).
28. D. Tsikas, *Anal. Biochem.* **379** (2), 139 (2008).

29. V. D. Mikoyan, L. N. Kubrina, V. A. Serezhenkov, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1336** (2), 225 (1997).
30. S. K. Jackson, M. P. Thomas, S. Smith, et al., *Faraday Discuss.* **126**, 103 (2004).
31. G. Dijkstra, H. van Goor, P. L. Jansen, and H. Moshage, *Curr. Opin. Invest. Drugs* **5** (5), 529 (2004).
32. M. J. Rand and C. G. Li. *Annu. Rev. Physiol.* **57**, 659 (1995).
33. O. Dietz and B. Huskamp, *Handbuch Pferdepraxis*, 3rd ed. (Enke, 2006).
34. M. Kovach, *Colic horses. Causes. Diagnosis. Treatment* (Royal Publ. House, 2010).
35. N. A. White and B. Edwards, *Handbook of Equine Colic* (Butterworth-Heinemann, 2001).
36. H. Bult, G. E. Boeckxstaens, P. A. Pelckmans, et al., *Nature* **345**, 346 (1990).
37. N. E. Robinson, *Current Therapy in Equine Medicine*, 5th ed. (Saunders, 2003).
38. C. A. Reinders, D. Jonkers, E. A. Janson, et al., *Scand. J. Gastroenterol.* **42** (10), 1151 (2007).
39. F. Dalloz, V. Maupoil, S. Lecour, et al., *Mol. Cell. Biochem.* **177**, 193 (1997).
40. C. Nathan and M. U. Shiloh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97** (16), 8841 (2000).
41. I. Bjarnason, J. Hayllar, A. J. MacPherson, and A. S. Russell, *Gastroenterol.* **104**, 832 (1993).
42. R. P. Mason and P. D. Josephy, *J. Inorg. Biochem.* **24** (2), 161 (1985).
43. B. Whittle, *Expert Opin. Investig. Drugs* **14** (11), 1347 (2005).
44. A. Slivka, R. Chuttani, D. L. Carr-Locke, et al., *J. Clin. Invest.* **94** (5), 1792 (1994).
45. S. Borniquel, E. A. Jansson, M. P. Cole, et al., *Free Radic. Biol. Med.* **48**, 499 (2010).
46. J. M. Lee, J. Y. Lim, Y. Kim, et al., *Exp. Ther. Med.* **12** (2), 573 (2016).
47. A. F. Vanin, *Nitric Oxide* **54**, 15 (2016).
48. A. F. Vanin, *Cell. Biochem. Biophys.* **77** (4), 279 (2019).
49. J. R. Hickok, D. Vasudevan, G. R. Thatcher, et al., *Antioxid. Redox Signal.* **17** (7), 962 (2012).
50. H. Ischiropoulos, *Arch. Biochem. Biophys.* **356** (1), 1 (1998).
51. D. Tsikas and J. C. Frölich, *Circ. Res.* **90**, 39 (2002).
52. V. Y. Titov, A. M. Dolgorukova, V. G. Vertiprakhov, et al., *Bull. Exp. Biol. Med.* **168**, 321 (2020).
53. E. D. Lamprecht and A. Carey, *Williams Oxid. Med. Cell. Longevity* **2012**, 1 (2012).
54. G. T. Mukosera, T. Liu, A. S. Ahmed, et al., *Nitric Oxide* **79**, 57 (2018).

Reduced Nitric Oxide Bioavailability in Horses with Colic: Evaluation by ESR Spectroscopy

V.A. Serezhenkov*, N.A. Tkachev*, Z.S. Artyushina**, M.I. Kuznetsova**,
M. Kovac***, and A.F. Vanin*

*Semenov Federal Research Center of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia

**K.I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology,
ul. Akademika Skryabina 23, Moscow, 109472 Russia

***"New Century" Veterinary Clinic, ul. Zhivotnovodov 1, Pozdnyakovo, Krasnogorsk, Moscow Region, 143421 Russia

The pathogenesis of diseases of the gastrointestinal tract of horses, which is caused by inflammation and oxidative stress, may be associated with a lack of nitric oxide, that controls various signaling pathways in the body. This study was aimed at determining the level of nitrites, metabolites of nitric oxide in horses with various intestinal diseases. The concentration of nitrite in blood serum was $3.60 \pm 3.02 \mu\text{M}$ and $8.3 \pm 6.0 \mu\text{M}$ in horses aged 7–26 years and 1–5 years, respectively. The sharp changes downwards in nitrite concentrations were observed in all horses with intestinal diseases ($3.39 \pm 2.85 \mu\text{M}$), especially in horses with flatulence ($0.6 \pm 0.4 \mu\text{M}$) and obstruction of the colon ($0.81 \pm 0.5 \mu\text{M}$).

Keywords: horse, ESR spectroscopy, nitrite, nitric oxide, dinitrosyl iron complexes, nitrosyl hemoglobin