



ВЕТЕРИНАРИЯ

DOI: 10.22363/2312-797X-2019-14-1-57-65

ОЦЕНКА УРОВНЯ НИТРИТА — МЕТАБОЛИТА ОКСИДА АЗОТА — У ЛОШАДЕЙ С СИМПТОМОКОМПЛЕКСОМ КОЛИК МЕТОДОМ ЭПР-СПЕКТРОСКОПИИ

З.С. Артюшина¹, П.Н. Абрамов¹, Н.Б. Полянский²,
Н.А. Ткачев³, В.А. Сереженков³

¹Московская государственная академия ветеринарной медицины
и биотехнологии имени К.И. Скрябина
Москва, Российская Федерация, 109472

²Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН
Москва, Российская Федерация, 119334

³Институт химической физики имени Н.Н. Семенова РАН
Москва, Российская Федерация, 119991
artyshina.zinaida@yandex.ru

Аннотация. Патогенез заболеваний пищеварительного тракта лошадей, сопровождаемых развитием воспаления и окислительного стресса, может быть связан с недостатком монооксида азота (NO), управляющего множеством сигнальных путей в организме. Монооксид азота (NO) принимает участие в работе иммунной и нервной систем, его уровень непосредственно определяет тонус всех сосудов и течение многих патологических процессов, NO следует отнести к числу наиболее важных факторов защиты слизистой желудка и кишечника. В работе подробно освещена методика определения уровня нитрита — метаболита оксида азота — при заболеваниях лошадей с симптомокомплексом истинных коликов, а также приведены результаты измерений нитрита в сыворотке здоровых животных двух возрастных групп: 1—5 лет и 6—25 лет и животных с патологией. Концентрация нитрита в сыворотке крови у лошадей возрастной группы 6—25 лет составила $3,42 \pm 4,22$ мкМ, при этом у молодых животных (1—5 лет) уровень этого показателя был $8,24 \pm 5,42$ мкМ, что в 2,4 раза выше. Резкое снижение нитрита отмечено у всех лошадей с заболеваниями кишечника $2,07 \pm 0,90$ мкМ, особенно при метеоризме $0,6 \pm 0,4$ мкМ и спастических коликах $1,78 \pm 0,5$ мкМ. Данные факты обуславливают диагностическую и прогностическую ценность оксида азота как биомаркера регуляции перистальтики кишечника в норме и при патологии.

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

Актуальность. Диагностика, профилактика и лечение заболеваний лошадей, протекающих с симптомокомплексом истинных коликов — одна из актуальных проблем ветеринарной медицины, поскольку они сопровождаются высокой смертностью животных и наносят значительный экономический ущерб.

Широкая распространенность заболеваний желудка и кишечника у лошадей, сложность и многогранность патогенеза, а также недостаточная освещенность вопросов дифференциальной диагностики актуализируют данную тему, требу-

ющую дальнейшего изучения, обуславливая ее высокую практическую и теоретическую значимость.

Введение. Заболевания пищеварительного аппарата лошадей имеют острый характер течения, обусловленный скрыто протекающими процессами (воспалительные явления, и как результат — развитие окислительного стресса — гиперпродукции активных форм кислорода), по причине возраста, физических нагрузок, кормления, наследственных факторов конкретного животного. По мнению ряда исследователей, в процессе патогенеза может снижаться уровень оксида азота, необходимого для нормальной работы как эндотелия сосудов и сфинктеров, так и органов в целом.

Монооксид азота (NO) наряду с двумя другими газообразными мессенджерами (CO и H₂S) принимает участие в работе иммунной и нервной систем, его уровень непосредственно определяет тонус сосудов и течение многих патологических процессов в организме. Особые физико-химические свойства данной молекулы определили способ ее транспортировки — в форме нитрозильных комплексов с гемовым железом, нитрозотиолов RSNO, а также высоко- и низкомолекулярных комплексов с негемовым железом с тиоловыми лигандами [1]. Это так называемые «комплексы 2.03» — моно- и биядерные динитрозильные комплексы (ДНКЖ).

NO синтезируется *in vivo* из L-аргинина под действием NO-синтетазы (NOS). NO модулирует активность белков посредством S-нитрозилирования: воздействию (NO⁺) подвергаются цистеиновые остатки. Синтез нитрозотиолов (RSNO) — регулируемая посттрансляционная модификация белка. Образование белковых динитрозильных комплексов при связывании тиоловыми группами железа (II) с NO также представляет собой форму посттрансляционного регулирования их активности. Один из наиболее распространенных методов при оценке степени воспалительного процесса — измерение уровня нитрата с использованием так называемого реактива Грисса — нельзя считать корректным, поскольку нитрат имеет различные источники происхождения в организме. В литературе также имеются данные об измерении концентрации нитрозотиолов (RSNO) [2].

Этот подход еще более спорный, в связи с большими методологическими трудностями их измерений, что приводит к разбросу данных в физиологических жидкостях и тканях здоровых животных до 10000 раз (от 1 нМ до 7 мкМ). В доступной литературе мы нашли публикации, связанные с измерением нитрата в сыворотке лошадей для оценки степени тяжести заболеваний [3].

Несмотря на очевидные показатели заболеваний у животных, оценка уровня нитрата не позволяла дифференцировать норму от патологии даже в случае исследования больших выборок животных [4]. Наиболее корректной оценкой уровня оксида азота в организме как в норме, так и при патологических состояниях следует считать измерение продукта его метаболизирования — нитрита [5, 6].

Поэтому целью нашей работы, исходя из анализа литературных сведений о возможной связи уровня оксида азота в сыворотке крови у лошадей с симптомокомплексом колик и характером патологических изменений функций пищеварительного аппарата в целом стало измерение уровня метаболита NO — нитрита методом спектроскопии электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) с использованием спиновых ловушек [7].

Материалы и методы исследования. Объектом исследования служили лошади в количестве 38 голов, при клиническом исследовании которых 8-ми был поставлен диагноз: катаральный спазм, закупорка большой ободочной кишки, колит, перемещение большой ободочной кишки, метеоризм.

С железом гемоглобина NO образует долгоживущие комплексы, позволяющие определять его непосредственно в образцах крови методом ЭПР. Для определения NO сыворотке мы использовали метод спиновых ловушек, основанный на применении дитиокарбамата и железа (II).

Для исследования брали кровь из яремной вены в пробирки с гепарином и центрифугировали в течение 10 минут на центрифуге модели CN80-2S «Armed» со скоростью 3000 об/мин для осаждения эритроцитов. После чего образцы сыворотки хранили в жидком азоте ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$). Для измерения концентрации нитрозо-гемоглобина была использована цельная кровь. Сигналы ЭПР регистрировали на спектрометре фирмы «Брукер» (ФРГ) ECS-106.

Метод определения NO, используемый в данной работе, основан на реакции образования нитрозотиола — нитрозоцистеина (RSNO) в кислой среде ($\text{pH} = 3,5$) из аниона нитрита NO_2^- и гидрохлорида цистеина. Затем нитрозоцистеин в присутствии железа (2+) и N-метил-D,L-глукосамин дитиокарбамата (МГД) (ловушка) образует водорастворимый парамагнитный мононитрозильный комплекс железа МНКЖ МГД-Fe-NO. Определение аниона нитрита NO_2^- проводили следующим образом: белки сыворотки после разморозки удаляли фильтрованием через фильтр Microcon, Millipore Corporation, USA в течение 20 минут при 14 500 об/мин на центрифуге Mini Spin plus, Eppendorf.

Разработанный нами метод позволяет, во-первых, контролировать влияние белков сыворотки на реакцию образования МНКЖ МГД; и, во-вторых, учесть вклад высокомолекулярных RSNO как дополнительного источника нитрита.

К 50 мкл цистеина концентрацией 400 мМ добавляли 10—120 мкл сыворотки, pH раствора доводили до 3,5 добавлением 0,01 мМ HCl. Спустя 5 минут добавляли 50 мкл 40 мМ сульфата железа (II), 200 мкл 400 мМ буфера (Трис или HEPES) и 200 мкл МГД концентрацией 250 мМ. Затем pH раствора повышали до 7,6 0,06%-ным раствором NaOH. В этих условиях образуется МНКЖ МГД-Fe-NO.

Для построения калибровочной кривой к 50 мкл цистеина гидрохлорида концентрацией 400 мМ добавляли раствор нитрита натрия концентрацией 480 мкМ разного объема (2—40 мкл), pH раствора доводили до 3,5 добавлением 0,01 мМ HCl. Спустя 5 минут добавляли 50 мкл 40 мМ железа сульфата, 200 мкл 200 мМ (Трис или HEPES), 200 мкл 250 мМ МГД, pH доводили до 7,6 0,06%-ным раствором NaOH. Через 10 мин записывали ЭРО спектр МНКЖ МГД-Fe-NO. Оценку концентрации нитрита в образце производили методом двойного интегрирования и сопоставления площадей ЭПР-сигналов исследуемого и стандартного образца. В качестве последнего использовали синтезированный комплекс МГД с железом (2+) и оксидом азота: МНКЖ МГД-Fe-NO. На рис. 1 представлена зависимость интенсивности ЭПР-сигнала от концентрации нитрита $[\text{C}] = 0,134 \text{ I} - 0,024$. Коэффициент корреляции $r = 0,984$ (метод Спирмена). Расчеты производились с помощью программного обеспечения ЭПР-спектрометра Bruker ECS-106.

Результаты. На рис. 1 показана зависимость интенсивности ЭПР-сигнала (площадь подынтегральной кривой) от концентрации нитрита в диапазоне 0,3—1,6 мкМ в образце после удаления сывороточных белков центрифугированием.

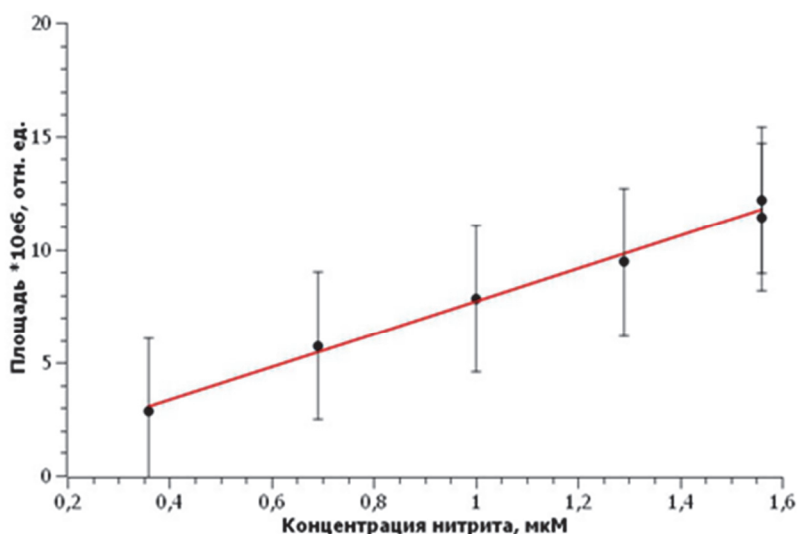


Рис. 1. Зависимость интенсивности ЭПР-сигнала (площадь подынтегральной кривой) от концентрации нитрита /
Fig. 1. Dependence of the intensity of the EPR signal (area of the integrand curve) on the concentration of nitrite

Используя построенную калибровочную кривую, были проведены измерения содержания нитрита в образцах сыворотки животных, что отражено в табл. 1.

Таблица 1 / Table 1

**Концентрация нитрита в сыворотке и нитрозогемоглобина в цельной крови лошади /
 Concentration of nitrite in serum and nitrosohemoglobin in whole horse blood**

№	Группы животных	Концентрация нитрозогемоглобина, мкМ, М ± m	Концентрация нитрита в сыворотке, мкМ, М ± m
1	Здоровые лошади, возраст от 1 года до 5 лет, n = 11	0,1 ± 0,1	Мин 0,63 ± 0,3 макс 18,9 ± 0,6
2	Здоровые лошади, возраст от 6 до 25 лет, n = 19	0,15 ± 0,1	Мин 0,30 ± 0,2 макс 15,4 ± 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	Перемещение большой ободочной кишки, 8 лет	0,3 ± 0,10	2,42 ± 1,30
7	Колит, 18 лет	*	2,47 ± 0,60
8	Хронические сезонные колики, закупорка тазового изгиба, 3,5 года	—	2,31 ± 0,60
9	Спастические колики, 6,5 лет	0,21 ± 0,10	1,78 ± 0,50
10	Колит (периодами), 3 года	—	6,12 ± 2,11

В таблице 1 приведены результаты измерений нитрита в сыворотке здоровых животных 2 возрастных групп 1—5 лет и 6—25 лет, а также 8 животных с патологией. Результаты статистической обработки полученных данных приведены в табл. 2.

Таблица 2 / Table 2

**Статистические показатели /
Statistical data**

	Молодые 1—5 лет	Возрастные 6—25 лет	Больные
Среднее ± ст. откл., мкМ	8,24 ± 5,42	3,42 ± 4,22	2,07 ± 0,90
Медиана, мкМ	8,7	1,5	2,4
Нормальное распределение тест Шапиро—Уилка, p	0,79	7*10 ⁻⁵	0,4274
	молодые / возрастные	молодые / больные	возрастные / больные
Форма распределения тест Колмогорова, p	0,0484	0,0074	0,6547
Медиана тест Манна—Уитни, p	0,0108	0,0391	0,2500
Среднее тест Стьюдента, p	0,0211	0,0036	0,1990

Для оценки степени различия использовали анализ формы распределения (тест Колмогорова) и сравнение медианы и среднего (тест Манна—Уитни и тест Стьюдента соответственно). Анализ показал значимые отличия по всем исследованным параметрам для возрастных и болеющих лошадей от молодых ($p = 0,0484$ и $0,0108$; $0,0074$ и $0,0391$), тогда как между выборками возрастных и болеющих различия незначимы ($p = 0,6547$ и $0,2500$).

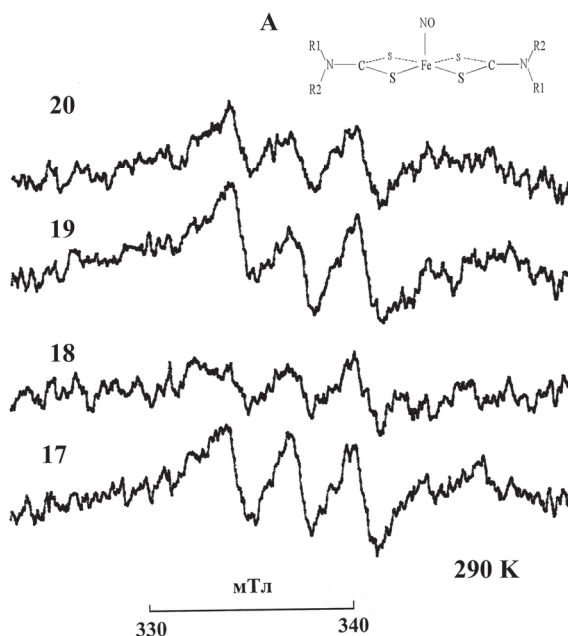


Рис. 2. Спектры ЭПР комплекса N-метил-D, L-глюкамин дитиокарбамата (МГД) с железом (2+) и оксидом азота МНКЖ МГД FeNO в сыворотке лошадей:

№ 17 — закупорка большой ободочной кишки, № 18 — метеоризм, № 19 — закупорка слепой кишки, № 20 — спастические колики. Вставка А — структурная формула парамагнитного комплекса МНКЖ МГД FeNO
Условия записи спектров: X-диапазон, центр поля 334 мТ, развертка 10 мТ, амплитуда модуляции 5 Гс, мощность СВЧ 20 мВт. Усиление $1 \cdot 10^5$, 1 накопление, температура 293 К

Fig. 2. EPR spectra of the N-methyl-D complex, L-glucamine dithiocarbamate (MGD) with iron (2+) and nitric oxide MNCJMGD FeNO in the horse sera:

No. 17 — congestion of the large colon, No. 18 — flatulence, No. 19 — blockage of the cecum, No. 20 — spastic colic. Insert A is the structural formula of the paramagnetic complex of the MNCJMGD FeNO

ОБСУЖДЕНИЕ

NO следует отнести к числу наиболее важных факторов защиты слизистой ЖКТ [8]. Известна роль NO как нейромедиатора в неадренергических/нехолинергических нейронах (NANC-нейроны), которые, наряду с холин- и норадренергическими проводниками автономной нервной системы, составляют третий тип автономной нервной системы [9, 10]. У лошадей имеются три автономных центра регуляции перистальтики, связанных с интерстициальными клетками Кахаля: гастродуоденальный центр, подвздошно-слепокишечный центр и центр тазового изгиба [10, 11].

Автономная нервная система кишечника использует в качестве нейромедиаторов вазоактивный интестинальный пептид (VIP) и NO [11, 12]. Установлено, что оксиду азота принадлежит существенная роль в активации синтеза бикарбонатов, регуляции кровотока и моторики ЖКТ. Показано участие NO в патологических процессах, протекающих в толстом кишечнике. Эти изменения могут способствовать нарушению моторики и абсорбции в кишечнике.

Полученные нами данные согласуются с представлениями о снижении уровня NO в случае наблюдения патологических изменений функций. Концентрация нитрита (табл. 1) в сыворотке крови у лошадей возрастной группы 6—25 лет составила $3,42 \pm 4,22$ мкМ, при этом у молодых животных (1—5 лет) уровень этого показателя был $8,24 \pm 5,42$ мкМ, что в 2,4 раза выше. Резкое снижение нитрита отмечено у всех лошадей с заболеваниями кишечника $2,07 \pm 0,90$ мкМ, особенно при метеоризме $0,6 \pm 0,4$ мкМ и спастических коликах $1,78 \pm 0,5$ мкМ.

Уровень нитрозогемоглобина (табл. 1) в цельной крови здоровых ($0,1 \pm 0,1$ мкМ и $0,15 \pm 0,1$ мкМ) и больных животных ($0,3 \pm 0,10$ мкМ и $0,21 \pm 0,10$ мкМ) соответствующих возрастных групп имеет отличия в величине среднего, но различия статистически незначимы.

Данные факты обуславливают диагностическую и прогностическую ценность оксида азота как биомаркера регуляции перистальтики кишечника в норме и при патологии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Уровень производного оксида азота — нитрита в крови больных лошадей имеет характерную тенденцию к понижению относительно здоровых лошадей.

На определенных этапах заболевания ЖКТ возникает дефицит NO, хотя вырабатываемого посредством eNOS, iNOS и nNOS оксида азота много, но его действие в качестве мессенджера недостаточно и, таким образом, сниженная биодоступность NO обуславливает нарушение функций ЖКТ у лошадей.

Исследования по оценке уровня оксида азота и его метаболита в крови, а также других показателей воспаления необходимо продолжить на большей выборке животных для получения более полной картины протекающих процессов при симптомокомплексе истинных колик у лошадей.

Информация о конфликте интересов: Нет.

Информация о финансировании. Тема Государственной Программы 0082-20140-001 № АААА-Ф17-117040610310-6.

Благодарности: Профессору Др. Миломиру Ковачу — DVM, MSc, PhD, а также сотрудникам ветеринарной клиники «Новый век». Доктору биологических наук К.О. Муранову за помощь при разработке методики.

Участие авторов: авторы имеют равноценный вклад в данной работе.

© **З.С. Артюшина, П.Н. Абрамов, Н.Б. Полянский,
Н.А. Ткачев, В.А. Сереженков, 2019.**

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- [1] *Mokh V.P., Poltorakov A.P., Serezhenkov V.A., Vanin A.F.* On the nature of a compound formed from dinitrosyl-iron complexes with cysteine and responsible for a long-lasting vasorelaxation // *Nitric Oxide*. 2010. Vol. 22. № 4. P. 266—274.
- [2] *Rocks S.A., Davies C.A., Hicks S.L., Webb A.J., Klocke R., Timmins G.S. et al.* Measurement of S-nitrosothiols in extracellular fluids from healthy human volunteers and rheumatoid arthritis patients, using electron paramagnetic resonance spectrometry // *Free Radical Biology & Medicine*. 2005. Vol. 39. № 7. P. 937—948.
- [3] *Galvin N., Dillon H., McGovern F.* Right dorsal colitis in the horse: minireview and reports on three cases in Ireland // *Irish Veterinary Journal*. 2004. Vol. 57. № 8. P. 467—473.
- [4] *Mirza M.H., Seahorn T.L., Oliver J.L., Hosgood G., Moore R.M.* Detection and comparison of nitric oxide in clinically healthy horses and those with naturally acquired strangulating large colon volvulus // *Can J Vet Res*. 2005. Vol. 69. P. 106—115.
- [5] *Kleinbongard P., Dejam A., Lauer T., Rassaf T., Schindler A., Picker O. et al.* Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals // *Free Radic Biol Med*. 2003. Vol. 35. № 7. P. 790—796.
- [6] *Tsikas D.* A critical review and discussion of analytical methods in the L-arginine/nitric oxide area of basic and clinical research // *Anal Biochem*. 2008. Vol. 379. № 2. P. 139—216.
- [7] *Jackson S.K., Thomas M.P., Smith S., Madhani M., Rogers S.C., James P.E.* In vivo EPR spectroscopy: biomedical and potential diagnostic applications // *Faraday Discuss*. 2004. Vol. 126. P. 103—117.
- [8] *Дроздов В.Н.* НПВП с собственным механизмом защиты желудка — реально ли это? // *Русский медицинский журнал, Медицина и здравоохранение*. 2013. Т. 21. № 30. С. 1596—1599.
- [9] *Dijkstra G., van Goor H., Jansen P.L., Moshage H.* Targeting nitric oxide in the gastrointestinal tract // *Cur Opin Invest Drugs*. 2004. Vol. 5. № 5. P. 529—536.
- [10] *Ковач М.* Колики лошади. Причины. Диагноз. Лечение. М.: Королевский издательский дом, 2010. 120 с.
- [11] *White N.A., Edwards B.* *Hanbook of Equine Colic*. Oxford: Butterworth-Heinemann, 2001.
- [11] *Робинсон Э.Ю.* *Болезни лошадей. Современные методы лечения*. М.: Аквариум-Принт, 2007. 1008 с.

Сведения об авторах:

Артюшина Зинаида Сергеевна — аспирант кафедры диагностики болезней, терапии, акушерства и биотехники размножения Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина; e-mail: artushina.zinaida@yandex.ru.

Абрамов Павел Николаевич — кандидат ветеринарных наук, доцент кафедры диагностики болезней, терапии, акушерства и биотехники размножения Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина; e-mail: Abramov_P@inbox.ru.

Полянский Николай Борисович — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории физико-химических основ регуляции клеточного метаболизма Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН; e-mail: npolinski@mail.ru.

Серезженков Владимир Анатольевич — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории физической химии биополимеров Института химической физики имени Н.Н. Семенова РАН; e-mail: serezhnikov@yandex.ru.

Ткачев Николай Анатольевич — кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории физической химии биополимеров Института химической физики имени Н.Н. Семенова РАН; e-mail: nitkachev@yandex.ru.

Для цитирования:

Артюшина З.С., Абрамов П.Н., Полянский Н.Б., Ткачев Н.А., Серезженков В.А. Оценка уровня нитрита — метаболита оксида азота — у лошадей с симптомокомплексом колик методом ЭПР-спектроскопии // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Агрономия и животноводство. 2019. Т. 14. № 1. С. 57—65. doi: 10.22363/2312-797X-2019-14-1-57-65.

DOI: 10.22363/2312-797X-2019-14-1-57-65

**ASSESSMENT OF NITRITE LEVEL —
NITRIC OXIDE DERIVATIVE — IN HORSES
WITH INTESTINAL COLIC BY ESR SPECTROSCOPY**

**Zinaida S. Artyushina¹, Pavel N. Abramov¹, Nikolai B. Polyansky²,
Nikolai A. Tkachev³, Vladimir A. Serezhnikov³**

¹Moscow state academy of veterinary medicine
and biotechnology named K.I. Skryabin
Moscow, 109472, Russian Federation

²Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences
Moscow, 119334, Russian Federation

³Semenov Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences
Moscow, 119991, Russian Federation

Abstract. The pathogenesis of diseases of the digestive tract of horses, accompanied by the development of inflammation and oxidative stress, can be associated with a lack of nitrogen monoxide, which controls a variety of signaling pathways in the body. Nitrogen monoxide (NO) takes part in the work of the immune and nervous systems, its level directly determines the tone of all blood vessels and the course of many pathological processes. NO should be considered as one of the most important factors in the protection of the gastric and intestinal mucosa. The article describes in detail the method for determining the level of nitrite-nitric oxide metabolite — in diseases of horses with the symptom complex of “true” colic, and also presents the results of measurements of nitrite in the serum of healthy animals of two age groups: 1—5 years and 6—25 years and animals with pathology. The concentration of nitrite in blood serum in horses of the age group of 6—25 years was $3.42 \pm 4.22 \mu\text{M}$, while in young animals (1—5 years) the level of this indicator was $8.24 \pm 5.42 \mu\text{M}$, which is 2,4 times higher. A sharp decrease of nitrite was noted in all horses with intestinal diseases of $2.07 \pm 0.9 \mu\text{M}$, especially with meteorism $0.6 \pm 0.4 \mu\text{M}$ and spastic colic $1.78 \pm 0.5 \mu\text{M}$. These facts determine the diagnostic and prognostic value of nitric oxide as a biomarker for the regulation of intestinal motility in normal and pathological conditions.

Key words: horse, intestinal colic, ESR-spectroscopy, nitrite, nitric oxide, nitrosothiols, dinitrosyl, iron complexes, nitrosyl hemoglobin

REFERENCES

- [1] Mokh VP, Poltorakov AP, Serezhenkov VA, Vanin AF. On the nature of a compound formed from dinitrosyl-iron complexes with cysteine and responsible for a long-lasting vasorelaxation. *Nitric Oxide*. 2010; 22(4):266—274. Available from: doi:10.1016/j.niox.2010.01.002.
- [2] Rocks SA, Davies CA, Hicks SL, Webb AJ, Klocke R, Timmins GS et al. Measurement of S-nitrosothiols in extracellular fluids from healthy human volunteers and rheumatoid arthritis patients, using electron paramagnetic resonance spectrometry. *Free Radical Biology & Medicine*. 2005; 39(7):937—948. Available from: doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.05.007.
- [3] Galvin N, Dillon H, McGovern F. Right dorsal colitis in the horse: minireview and reports on three cases in Ireland. *Irish Veterinary Journal*. 2004; 57(8):467—473. Available from: doi: 10.1186/2046-0481-57-8-467.
- [4] Mirza MH, Seahorn TL, Oliver JL, Hosgood G, Moore RM. Detection and comparison of nitric oxide in clinically healthy horses and those with naturally acquired strangulating large colon volvulus. *Can J Vet Res*. 2005; 69:106—115.
- [5] Kleinbongard P, Dejam A, Lauer T, Rassaf T, Schindler A, Picker O et al. Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals. *Free Radic Biol Med*. 2003; 35(7): 790—796. Available from: doi: 10.1016/S0891-5849(03)00406-4.
- [6] Tsikas D. A critical review and discussion of analytical methods in the L-arginine/nitric oxide area of basic and clinical research. *Anal Biochem* 2008; 379(2):139—216. Available from: doi: 10.1016/j.ab.2008.04.018.
- [7] Jackson SK, Thomas MP, Smith S, Madhani M, Rogers SC James PE. In vivo EPR spectroscopy: biomedical and potential diagnostic applications. *Faraday Discuss*. 2004; 126: 103—117. Available from: doi: 10.1039/B307162F.
- [8] Drozdov VN. NSAIDs with their own mechanism of protection of the stomach — is it real? *Russian Medical Journal*. 2013; 21(30):1596—1599. (In Russ)
- [9] Dijkstra G, van Goor H, Jansen PL, Moshage H. Targeting nitric oxide in the gastrointestinal tract. *Cur Opin Invest Drugs*. 2004; 5(5):529—36.
- [10] Kovach M. Colic in horses. Causes. Diagnosis. Treatment. Moscow: Korolevskii Izdatel'skii Dom Publ.; 2010. (In Russ).
- [11] White NA, Edwards B. Handbook of Equine Colic. Oxford: Butterworth-Heinemann; 2001.
- [12] Robinson NE. Current Therapy in Equine Medicine. 5th Edition. Saunders; 2003.