



## МЕТОД ОЦЕНКИ РИСКА ИНФАРКТА МОЗГА

(инструкция по применению)

### УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

Учреждение образования «Гомельский государственный медицинский университет»

### АВТОРЫ:

М.Н. Стародубцева, Н.В. Галиновская, Е.В. Воропаев,  
О.А. Иванцов, Д.Р. Петренев, Е.А. Липская

Гомель, 2015

В настоящей инструкции по применению (далее инструкция) изложен метод оценки риска инфаркта мозга (ИМ) при проведении его вторичной профилактики в группе лиц с преходящими нарушениями мозгового кровообращения (ПНМК), включающих транзиторную ишемическую атаку и церебральный гипертонический криз (код МКБ-10 – G45). Вышеуказанная группа дополнительно подразделяется по уровню производства активных форм азота (АФА), в данном случае, монооксида азота (NO) и пероксинитрита в остром периоде ПНМК. Описанный в инструкции метод предназначен для проведения технологического процесса спектрофотометрического определения концентрации стабильных метаболитов NO: нитрит- и нитрат-ионов (NO<sub>x</sub>) в плазме крови, на основе которого осуществляется ранжирование пациентов с ПНМК. Методология исследования основана на различии в скорости производства NO, определяемому по уровню NO<sub>x</sub>, в клетках (в основном, иммунной системы и эндотелия) в норме и при их активации в условиях патологического процесса, на фоне которого развивается ПНМК.

Инструкция предназначена для врачей-лаборантов, врачей-терапевтов и врачей-неврологов лечебно-диагностических стационаров различного профиля.

#### **Перечень необходимых медицинских изделий, реактивов и пр.**

Лабораторное оборудование, применяемое для определения концентрации NO<sub>x</sub> в плазме крови, представлено в таблице 1.

Таблица 1 — Оптимальный набор оборудования

Наименование оборудования и основные характеристики	Количество
Высокоскоростная термостатированная центрифуга (10 000 – 15 000×g) с ротором для пробирок типа «Eppendorf» объемом	1

1,5мл, с диапазоном рабочих температур от 0°С до +25 °С	
Твердотельный термостат с возможностью поддержания рабочей температуры от 0°С до 100°С	1
Бытовая морозильная камера с возможностью поддержания рабочей температуры минус 20°С	1
Планшетный спектрофотометр, позволяющий проводить измерения на длинах волн 550 нм и 650 нм	1
Шкаф вытяжной лабораторный	1
Весы торсионные	1

Также необходимы следующие расходные материалы: микроцентрифужные пробирки на 1,5 мл; планшеты 96-ти луночные прозрачные; дозаторы пипеточные разных объемов; наконечники с фильтром разных объемов; халаты, резиновые перчатки, фильтровальная бумага, штативы для пробирок, стеклянная химическая посуда и др.

В таблице 2 приведен список реагентов для проведения исследования.

Таблица 2 – Список реагентов, необходимых для проведения анализа

Наименование реагентов
Реактив Грисса, состоящий из двух равных частей: раствора I (0.1% раствор N-(1-нафтил)-этилендиамина в деионизированной воде), раствора II (0,35% раствор 4,4'-диаминодифенилсульфона в 2Н соляной кислоте)
Хлорид ванадия III (VCl <sub>3</sub> )
Раствор соляной кислоты 0,1Н
Этанол 96%
Нитрат калия (10мМ раствор)

Для установления концентрации  $\text{NO}_x$  в плазме крови применяют метод определения концентрации нитрит-ионов на основе реакции Грисса с образованием окрашенного продукта, концентрацию которого определяют спектрофотометрически с помощью микропланшетного фотометра с использованием в качестве основной длины волны  $\lambda=550$  нм, а в качестве референсной –  $\lambda=650$  нм. Нитрат-ионы предварительно восстанавливают в реакции с хлоридом ванадия III ( $\text{VCl}_3$ ). Работа с растворами проводится в вытяжном шкафу в резиновых перчатках.

### **Показания к применению**

Преходящие нарушения мозгового кровообращения в остром периоде, включающие транзиторную ишемическую атаку и церебральный гипертонический криз (код МКБ-10 – G45).

### **Противопоказания для применения**

Отсутствуют.

### **Описание технологии используемого метода**

#### **1. Материал для исследования**

Используется кровь из периферической (локтевой) вены. Забор крови проводится утром натощак в пробирку, обработанную раствором этилендиамина. Полученный материал смешивается путем плавного переворачивания пробирки 4-5 раз и доставляется в лабораторию. Забор крови у одного пациента осуществляется дважды: при его поступлении в стационар на 1-2 сутки (или при первом после ПНМК амбулаторном обращении) и на 10-е сутки острого периода ПНМК.

#### **2. Проведение измерений**

Для определения концентрации  $\text{NO}_x$  в плазме крови используется метод с одновременным восстановлением нитрат-ионов до нитрит-ионов и определением концентрации нитрит-ионов с помощью модифицированного реактива Грисса. Образцы плазмы крови объемом

300 мкл смешивают с 600 мкл этанола (96%) в полипропиленовых пробирках с крышкой типа Эппендорф (1,5 мл), инкубируют в течение 1 часа ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) и центрифугируют в течение 2 мин ( $4^{\circ}\text{C}$ , 14000 g). Затем 500 мкл супернатанта переносят в чистые пробирки и смешивают с 250 мкл свежеприготовленного реактива Грисса, состоящего из 2 частей  $\text{VCl}_3$  (8 г/л в 0,1 М  $\text{HCl}$ ), 1 части раствора I (0,1% раствор N-(1-нафтил)-этилендиамина в деионизированной воде) и 1 части раствора II (0,35% раствор 4,4'-диаминодифенилсульфона в 2Н  $\text{HCl}$ ). После этого образцы инкубируют в течение 30 мин ( $37^{\circ}\text{C}$ ) с периодическим перемешиванием содержимого. Образцы снова центрифугируют в течение 2 мин ( $4^{\circ}\text{C}$ , 14000 g), и 300 мкл супернатанта переносят в ячейки прозрачных 96-луночных планшетов. Оптическую плотность на длине волны 550 нм измеряют с помощью планшетного фотометра. Концентрацию  $\text{NO}_x$  определяют по калибровочной кривой, построенной по результатам измерения оптической плотности для водного раствора нитрита натрия с линейным участком в диапазоне концентраций 0,1–100,0 мкМ/л.

### **3. Заключение**

Определение параметров распределения нитрит- и нитрат-ионов в плазме крови пациентов с ПНМК с помощью модифицированного реактива Грисса в динамике острого периода имеет важное прогностическое значение и может быть использовано для формирования групп адресной активной вторичной профилактики ИМ, нуждающихся в дополнительном контроле и лечебных мероприятиях по коррекции эндотелиальной дисфункции (код МКБ-10 – Z03 «Медицинское наблюдение и оценка при подозрении на заболевание или патологическое состояние»). В соответствии с выявленным нормальным диапазоном концентрации  $\text{NO}_x$  в плазме крови, граничным верхним значением которого является 33 мкМ, пациенты с ПНМК на десятые сутки

острейшего периода заболевания в зависимости от динамики концентрации  $\text{NO}_x$  в плазме крови могут быть отнесены к одной из **четырёх групп риска по возникновению ИМ** для определения направления вторичной профилактики ИМ.

**Группа низкого риска:** Концентрация  $\text{NO}_x$  не превышает пороговых значений контроля и не увеличивается в течение острого периода и составляет при первом (1-2 сутки) и при повторном измерении (10 сутки)  $< 33$  мкМ.

*Мероприятия в группе:* Динамическое наблюдение, выполнение мероприятий по вторичной профилактике ИМ согласно приказу Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 09.09.2011 №878 «Об утверждении Инструкции по профилактике инфаркта мозга и транзиторных ишемических атак» (далее – Приказ МЗ РБ №878) и «Клиническим протоколам диагностики и лечения больных с патологией нервной системы» (далее – клинические протоколы).

**Группа среднего риска:** Группа компенсированной эндотелиальной дисфункции, концентрация  $\text{NO}_x$  при первом измерении (1-2 сутки) составляет  $> 33$  мкМ, а при повторном измерении (10 сутки)  $-< 33$  мкМ.

*Мероприятия в группе:* Динамическое наблюдение, выполнение мероприятий по вторичной профилактике ИМ согласно приказу МЗ РБ № 878 и клиническим протоколам. Динамический контроль  $\text{NO}_x$  на 30 сутки острого периода. При отсутствии нарастания  $\text{NO}_x$  – действия аналогичны группе 1.

**Группа высокого риска:** Концентрация  $\text{NO}_x$  не превышает пороговые значения при первом измерении (1-2 сутки) ( $< 33$  мкМ), но нарастает в процессе острейшего периода (при повторном измерении (10 сутки)  $>33$  мкМ), что свидетельствует об усугублении эндотелиальной дисфункции и является предиктором неблагоприятного прогноза по возникновению ИМ.

**Мероприятия в группе:** Динамическое наблюдение, выполнение мероприятий по вторичной профилактике ИМ согласно приказу МЗ РБ № 878 и клиническим протоколам. Динамический контроль NO<sub>x</sub> на 30 сутки острого периода. Обязательна дополнительная антиоксидантная терапия.

**Группа крайне высокого риска:** Концентрация NO<sub>x</sub> стабильно высокая, что свидетельствует о выраженной эндотелиальной дисфункции в сочетании с асептическим воспалительным процессом. концентрация NO<sub>x</sub> составляет при первом (1-2 сутки) и при повторном измерении (10 сутки) > 33 мкМ.

**Мероприятия в группе:** Динамическое наблюдение, выполнение мероприятий по вторичной профилактике ИМ согласно приказу МЗ РБ № 878 и клиническим протоколам. Динамический контроль NO<sub>x</sub> на 30 сутки острого периода. Антиоксидантная терапия. Дополнительное обследование для выявления базового процесса, приводящего к активации NO-синтаз (проведение ультрасонографической диагностики сердца, ультразвуковой диагностики состояния органов брюшной полости).

#### **4. Возможные ошибки при проведении определения NO<sub>x</sub>**

1. Забор материала для определения уровня NO<sub>x</sub> следует проводить утром, натощак, в покое, так как прием пищи, богатой нитратами, оказывает влияние на результаты определения концентрации NO<sub>x</sub> в плазме крови.

2. Обязательным условием является депривация курения у пациентов с ПНМК.

3. Искажение результатов определения концентрации NO<sub>x</sub> в плазме крови может быть вызвано приемом нитрат-содержащих лекарственных препаратов, что следует учитывать при составлении карты пациента.

## ОБОСНОВАНИЕ ЦЕЛЕСООБРАЗНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА ОЦЕНКИ РИСКА ИНФАРКТА МОЗГА

Преходящие нарушения мозгового кровообращения (ПНМК) – остро возникающее изменение мозговых функций сосудистого генеза, проявляющееся очаговой, общемозговой или смешанной симптоматикой, регрессирующей в течение 24 часов, включающие транзиторную ишемическую атаку и церебральный гипертонический криз [1, 2, 5]. По статистике у 4-8% пациентов, перенесших кратковременный неврологических дефицит сосудистого генеза, в течение месяца после первого эпизода развивается инфаркт мозга, а в течение 5 лет 30% заболевших имеют стойкий дефект [3,4].

Развитие патологии сосудистого генеза могут вызывать множество факторов [4]. Однако все они запускают несколько основных механизмов, вовлекающих в процесс три типа клеток: эндотелиальные, мышечные и клетки крови (в основном лейкоциты). Одним из ключевых участников этих механизмов является монооксид азота (NO) и его производные, включая пероксинитрит ( $\text{NO}_x$ ) [48]. В сердечно-сосудистой системе NO выполняет ряд важных функций: вызывает вазодилатацию, снижение артериального давления, подавляет пролиферацию гладкомышечных клеток сосудов, уменьшает область повреждения, подавляет взаимодействие лейкоцитов с клетками эндотелия, предотвращает развитие атеросклероза, активирует гуанилатциклазу и т.д. [27]. Уменьшение доступности NO критически сказывается на функционировании сосудистой системы.

$\text{NO}_x$  способствует снижению концентрации NO несколькими путями. Во-первых, NO взаимодействует с супероксидным анион-радикалом с образованием пероксинитрита. Во-вторых, пероксинитрит способен



переключить активность NO-синтазы на синтез супероксидного анион-радикала, а не NO. Как агент, вызывающий окислительный стресс, NO<sub>x</sub> запускает апоптоз кардиомиоцитов, эндотелиальных клеток и гладкомышечных клеток сосудов, уменьшает сократительную способность кардиомиоцитов, вызывает необратимое ингибирование митохондриального дыхания. NO<sub>x</sub> способствует экспрессии «молекул адгезии» на поверхности эндотелиальных клеток, адгезии лейкоцитов, активации функций лейкоцитов и продолжению воспалительного процесса. NO<sub>x</sub> нарушает структуру гликокаликса эндотелиальных клеток, межклеточного матрикса и структуру цитоскелета, а также активировать матрикс металлопротеиназу и ренин-ангиотензиновую систему, индуцируя некротическую гибель клеток сосудов и сердца [29].

Действие NO<sub>x</sub> на сердечно-сосудистую систему является двойственным [3]. Этот агент может снижать выраженность сосудистого ответа на различные стимулы, либо вызывать вазодилатацию. Вазодилатация наблюдается *in vitro* при использовании NO<sub>x</sub> в малых концентрациях (1 мкМ и меньше), а также при повторяющемся введении NO<sub>x</sub> в умеренных концентрациях (100 мкМ) [27-14]. Точные механизмы вазодилатации при действии NO<sub>x</sub> до сих пор не ясны. Предполагают, что они включают окисление тиолов пероксинитритом с образованием нитрозотиолов, доноров NO, который и вызывает дилатацию сосудов, и активацию NO<sub>x</sub> аденозин-трифосфат-зависимых калиевых каналов [20]. При этом отмечается, что при повторяющемся введении NO<sub>x</sub> в умеренных концентрациях наблюдается тахифилаксия, так как дилатация сосудов не может продолжаться долго при введении пероксинитрита в больших концентрациях. В этом случае проводимость аденозин-трифосфат-зависимых калиевых каналов снижается [31, 14]. Показано, что в зависимости от конкретных условий NO<sub>x</sub> может как ингибировать, так и

стимулировать агрегацию тромбоцитов [30]. В нескольких сообщениях описано положительное действие  $\text{NO}_x$ , вводимого внутривенно при ишемии-реперфузии (уменьшение размеров области инфаркта, улучшение сократительных и сосудистых функций) [33-35]. Многие исследователи считают, что  $\text{NO}_x$  может вносить существенный вклад в такие формы кардиопротекции, как прекондиционирование и посткондиционирование, предотвращая некротическую смерть клеток [10-18]. Пероксинитрит считают также и одним из основных участников развития толерантности к нитратам вследствие модифицирования им сигнальных путей с участием циклического гуанин-монофосфата [13].

В организме человека существует несколько форм NO-синтазы: конституциональные (нейрональная NO-синтаза (nNOS1) и эндотелиальная NO-синтаза (eNOS3) и индуцибельная NO-синтаза (iNOS2). Конститутивные NOS образуют NO в наномолярных концентрациях, а индуцибельные – в микромолярных. Основными производителями NO в организме являются клетки иммунной системы (нейтрофилы и макрофаги) и эндотелиальные клетки. NO вступает в реакцию либо с молекулой кислорода с образованием азотистого ангидрида, либо с супероксидным анион-радикалом с образованием пероксинитрита. Азотистый ангидрид реагирует с SH-группами (в основном, тиолов) с образованием различных нитрозопроизводных (включая нитрозогемоглобин, нитрозоальбумин, нитрозоцистеин, нитрозоглутатион). При взаимодействии с молекулой воды азотистый ангидрид образует нитрит-ион. В реакциях  $\text{NO}_x$  с белками, липидами и нуклеиновыми кислотами образуются нитропроизводные этих соединений. При спонтанном распаде пероксиазотистой кислоты в реакциях с металлами, их комплексами и металлсодержащими белками образуются нитрат- и нитрит-ионы. При стрессе, вызванном факторами

разной природы, в клетках, включая клетки иммунной системы, образуется в высокой концентрации супероксидный анион-радикал, что значительно увеличивает вероятность трансформации NO по пути, связанным с участием пероксинитрита. Таким образом, концентрация NO<sub>x</sub> в крови характеризует, в основном, общую ответную реакцию организма на стрессовое воздействие и, в меньшей степени, локальный воспалительный процесс. Концентрация NO<sub>x</sub> крови является динамическим показателем [21]. Она изменяется при таких стрессовых воздействиях на организм, как голодание, недостаток жидкости, кислорода, при физических нагрузках. В дополнение к нитрит- и нитрат ионам, образующимся в организме человека, эти соединения могут поступать в организм человека с пищей и водой. С помощью бактерий, населяющих человеческий организм, нитрат-ионы могут восстанавливаться до нитрит-ионов. Концентрация NO<sub>x</sub> в крови коррелирует с уровнем этих соединений в желудочном соке [42]. «Время жизни» (t<sub>1/2</sub>) нитрит-ионов в крови меньше 2 минут, а нитрат-ионов – около 5–8 часов [21]. Если взятие крови происходит через 10–12 часов после принятия пищи, то нитрат-ионы, содержащиеся в пищевых продуктах, практически полностью выводятся из крови и не фиксируются в результатах анализа в плазме крови [43]. Концентрация NO<sub>x</sub> в крови изменяется (увеличивается) с возрастом, эти изменения носят нелинейный характер и зависят от пола пациента [43, 12]. Курение, в том числе курение кальяна, а также ожирение, беременность способствуют повышению концентрации NO<sub>x</sub> в крови [12, 49]. Средние концентрации нитрит- и нитрат-ионов в крови людей лежат в диапазоне от 5 до 90 мкМ с наиболее вероятным значением в области 20-30мкМ [28, 39].

Ишемия и реперфузия мозга ведут к активации NOS. При активации eNOS3 NO продуцируется в небольших концентрациях и выполняет

нейропротекторную функцию: увеличивает ток крови по коллатералям, снижает выраженность апоптоза и уменьшает агрегацию тромбоцитов. Кальций зависимое стимулирование активности nNOS1 и iNOS2 в клетках иммунной системы и в глиальных клетках ведет к перепроизводству NO и образованию NO<sub>x</sub>, модифицирующего структуру белков и липидов, вызывающего дисфункцию митохондрий, разрушение генетического материала [29]. Наиболее чувствительными к действию NO<sub>x</sub> в тканях мозга являются митохондрии и структурные белки (промежуточные микрофиламенты, нейрофиламенты-L и кислые белки волокон глии). Нитрование даже 10 % нейрофиламентов-L является достаточным для разрушения нейрофиламентной структуры [29]. Нитрование тирозина NO<sub>x</sub> может ускоряться супероксиддисмутазой [47].

Нашими собственными данными была продемонстрирована разнонаправленная динамика NO<sub>x</sub> у пациентов с ПНМК в процессе течения острого периода [50]. Анализ концентрации NO, интерлейкинов 6, 8, С-реактивного белка и активности супероксиддисмутазы в крови пациентов с ПНМК за период 10 дней острого периода в стационаре позволил установить различие механизмов, участвующих в протекании патологического процесса, обусловленного как разной природой нарушения кровообращения мозга, так и различным базовым состоянием организма [50]. Выявление подобных дополнительных факторов, не учитываемых при рутинном исследовании в составлении прогноза, требует обязательного учета и проведения соответствующих коррекционных мероприятий.

## Список использованной литературы:

- 1 Метельская, В.А. Скрининг-метод определения уровня метаболитов оксида азота в сыворотке крови / В.А. Метельская, Н.Г. Гуманова // Клиническая лабораторная диагностика.– 2005.–№ 6.–С.15–18.
- 2 Окрут, И.Е. Изменение концентрации оксида азота и активности свободнорадикального окисления в крови больных раком молочной железы /Е. Окрут, Д.А. Шакерова, Т.А. Веселова // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. – 2011. - № 5. - С. 118–121.
- 3 Стародубцева, М. Н. Двойственная роль пероксинитрита в организме / М. Н. Стародубцева // Проблемы здоровья и экологии. – 2004. – № 1. – С. 35–41.
- 4 Приказ Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 09.09.2011 № 878 «Об утверждении Инструкции по профилактике инфаркта мозга и транзиторных ишемических атак».
- 5 Клинические протоколы диагностики и лечения больных с патологией нервной системы // Здравоохранение. – 2009. – № 4. – С. 62-74.
- 6 An exonic peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  coactivator-1 $\beta$  variation may mediate the resting energy expenditure through a potential regulatory role in important gene expression in this pathway/К. Mirzaei [et al.] //J. Nutrigenet Nutrigenomics. – 2012.– Vol.5, №2.– 59-71.
- 7 Feinleib, M. Epidemiology and control of hypertension/ M. Feinleib, R. Garrison, N. Borhani// Studies of hypertension in twins. New York. – 1975. – P. 3–20.
- 8 Boghdady, N.A. Evaluation of oxidative stress markers and vascular risk factors in patients with diabetic peripheral neuropathy / N. A.

Boghdady, G. A. Badr // Cell Biochem. Funct. - 2012 Feb 7. doi: 10.1002/cbf.2808.

9 Concentration- and stage-specific effects of nitrite on colon cancer cell lines / H. Jiang [et al.] // Nitric Oxide. – 2012. – Vol. 26, № 4. – P. 267-273.

10 Evidence for the involvement of peroxynitrite in ischaemic preconditioning in rat isolated hearts / S. Altug [et al.] // Br. J. Pharmacol. – 2000. – Vol. 130. – P. 125–131.

11 Ferdinandy, P. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite in myocardial ischaemia-reperfusion injury and preconditioning / P. Ferdinandy, R. Schulz // Br. J. Pharmacol. – 2003. Vol. 138. – P. 532–543.

12 Ghasemi, A. Reference values for serum nitric oxide metabolites in an adult population. / A. Ghasemi, S. Zahediasl, F. Azizi // Clin. Biochem. – 2010. – Vol. 43. – P. 89–94.

13 Gori, T. Nitrate tolerance: a unifying hypothesis / T. Gori, J.D. Parker // Circulation. – 2002. – Vol. 106. – P. 2510–2513.

14 Graves, J.E. Loss of KATP-channel-mediated vasodilation after induction of tachyphylaxis to peroxynitrite / J.E. Graves, S.J. Lewis, N.W. Kooy // J. Cardiovasc. Pharmacol. – 2005. – Vol. 46. – P. 646–652.

15 Higher serum nitrate levels are associated with poor survival in lung cancer patients / M. Colakogullaria [et al.] // Clin. Biochem. – 2006.- Vol.39, № 9. – P. 898–903.

16 Hottenga, J.J., Heritability and stability of resting blood pressure./ J.J. Hottenga, D.I. Boomsma, N. Kupper, [et al.] // Twin Res. Hum. Genet.– 2005.– № 8.– P.499–508.

17 <http://www.genome.gov/gwastudies>.

- 18 Hypoxic postconditioning enhances the survival and inhibits apoptosis of cardiomyocytes following reoxygenation: role of peroxynitrite formation / H.C. Wang [et al.] // *Apoptosis*. – 2006. – Vol. 11. – P. 1453–1460.
- 19 Increased oxidative/nitrosative stress and decreased antioxidant enzyme activities in prostate cancer / Z. Arsova-Sarafinovska [et al.] // *Clin. Biochem.* – 2009. – Vol. 42, № 12. – P. 1228-1235.
- 20 Involvement of nitric oxide and nitrosothiols in relaxation of pulmonary arteries to peroxynitrite / M. Wu [et al.] // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 1994. – Vol. 266. – P. H2108–H2113.
- 21 Kelm, M. Nitric oxide metabolism and breakdown / M. Kelm // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1999. – Vol. 1411. – P. 273-289.
- 22 Low serum neutrophil count predicts a positive prostate biopsy / K. Fujita [et al.] // *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*. – 2012. – Vol. 15. – P. 386—390.
- 23 Marzinzig, M. Improved methods to measure end products of nitric oxide in biological fluids: nitrite, nitrate, and S-nitrosothiols / M. Marzinzig [et al.] // *Nitric Oxide*. – 1997. – Vol. 1, №2. – P. 177–189.
- 24 Mechanisms of cardioprotection by peroxynitrite in myocardial ischemia and reperfusion injury / T.O. Nossuli [et al.] // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 1998. – Vol. 275. – P. H509–H519.
- 25 Myocardial ischemic preconditioning in rodents is dependent on poly (ADP-ribose) synthetase / L. Liaudet [et al.] // *Mol. Med.* – 2001. – Vol. 7, № 6. – P. 406–417.
- 26 Nitric oxide and lipid peroxidation are increased and associated with decreased antioxidant enzyme activities in patients with age-related macular degeneration / C. Evereklioglu [et al.] // *Doc. Ophthalmol.* – 2003. – Vol. 106, № 2. – P. 129-136.

- 27 Osiecki, H. The role of chronic inflammation in cardiovascular disease and its regulation by nutrients / H. Osiecki // *Altern. Med. Rev.* – 2004. – Vol. 9, № 1. – P. 32–53.
- 28 Oxidative profile in patients with colon cancer: effects of *Rutachalepensis L.* / R. Acquaviva [et al.] // *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* – 2011. – Vol.15, №2. – P. 181-191.
- 29 Pacher, P. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease / P. Pacher, J.S. Beckman, L. Liaudet // *Physiol. Rev.* – 2007. – Vol. 87, № 1. – P. 315–424.
- 30 Paradoxical fate and biological action of peroxynitrite on human platelets / M.A. Moro [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1994. – Vol. 91. – P. 6702–6706.
- 31 Peroxynitrite impairs cardiac contractile function by decreasing cardiac efficiency / R. Schulz [et al.] // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 1997. – Vol. 272. – P. H1212–H1219.
- 32 Peroxynitrite induces both vasodilatation and impaired vascular relaxation in the isolated perfused rat heart / L.M. Villa [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1994. – Vol. 91. – P. 12383–12387.
- 33 Peroxynitrite inhibits leukocyte-endothelial cell interactions and protects against ischemia/reperfusion injury in rats / D.J. Lefer [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 1997. – Vol. 99. – P. 684–691.
- 34 Peroxynitrite reduces myocardial infarct size and preserves coronary endothelium after ischemia and reperfusion in cats / T.O. Nossuli [et al.] // *Circulation.* – 1997. – Vol. 96. – P. 2317–2324.
- 35 Peroxynitrite, the breakdown product of nitric oxide, is beneficial in blood cardioplegia but injurious in crystalloid cardioplegia / R.S. Ronson [et al.] // *Circulation.* – 1999. – Vol. 100, Suppl. II. – P. II–384 –II–391.



36 Phase II study of pomegranate juice for men with rising prostate-specific antigen following surgery or radiation for prostate cancer / J. Allan [et al.] // *J. Clin. Cancer Res.* – 2006. – Vol. 12. – P. 4018-4026.

37 Plasma levels of nitrate and risk of prostate cancer: a prospective study / T. Wu [et al.] // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* – 2013. – Vol. 22, № 7. – P. 1210-1218.

38 Preconditioning decreases ischemia/reperfusion-induced peroxynitrite formation / C. Csonka [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2001. – Vol. 285. – P. 1217–1219.

39 Preoperative plasma vascular endothelial growth factor but not nitrite is a useful complementary tumor marker in patients with colorectal cancer / W. S. Tsai [et al.] // *Dis. Colon. Rectum.* – 2006. – Vol. 49, № 6. – P. 883-894.

40 Risch, N., Merikangas, K. The future of genetic studies of complex human diseases / N. Risch, K. Merikangas // *Science.* – 1996. – Vol. 273. – P. 1516–1517.

41 Role of nitric oxide and oxidative stress in ischaemic myocardial injury and preconditioning. / A. Berges [et al.] // *Acta Cardiol.* – 2003. – Vol. 58. – P. 119–132.

42 Serum nitrate/nitrite concentration correlates with gastric juice nitrate/nitrite: a possible marker for mutagenesis of the proximal stomach / H. Kishikawa [et al.] // *Digestion.* – 2011. – Vol. 84, №1. – P. 62-69.

43 Serum nitric oxide metabolite (NOX) levels in hypertensive patients at rest: a comparison of age, gender, blood pressure and complications using normotensive controls / H. Higashino [et al.] // *Clin. Exp. Pharm. Physiol.* – 2007. – Vol. 34. – P. 725–731.

44 Serum nitric oxide metabolite levels in groups of patients with various diseases in comparison of healthy control subjects / H. Higashino [et al.] // J. Med. Sci. – 2010. – Vol. 10. – P. 1-11.

45 Söletormos, G. Design of tumor biomarker–monitoring trials: a proposal by the European group on tumor markers / G.Söletormos[et al.] // Clin. Chem. –2013.–Vol. 59, № 1. – P. 52-59.

46 Sturgeon, C. Practice guidelines for tumor marker use in the clinic / C.Sturgeon//Clin. Chem. – 2002.– Vol. 48, №8. – P. 1151-1159.

47 Superoxide dismutase and the death of motoneurons in ALS. / J.S. Beckman [et al.] // Trends Neurosci. – 2001. – Vol. 24. – P. S15–S20.

48 Szabo C. Pathophysiological roles of peroxynitrite in circulatory shock. / C. Szabo, K. Modis // Shock. – 2010. – Vol. 34 Suppl. 1. – P. 4–14.

49 The influence of cigarette and qalyan (hookah) smoking on serum nitric oxide metabolite concentration / A. Ghasemi [et al.] // J. Clin. Lab. Investig. – 2010. – Vol. 70. – P. 116–121.

50 Starodubtseva, M.N. Nitric Oxide and Interleukin-6 Production in Patients with Transient Cerebral Microcirculatory Disturbances / M.N. Starodubtseva [et al.] // American Journal Clin Neurology and Neurosurgery – 2015. – Vol. 1. – № 2. – P. 86-91.