

# Количественное определение циклического гуанозинмонофосфата (ц-ГМФ) в тканях крыс с помощью жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии

Попов Н. С.<sup>1</sup>, Балабаньян В. Ю.<sup>2</sup>, Колгина Н. Ю.<sup>1</sup>,  
Петров Г. А.<sup>1</sup>, Донсков С. А.<sup>1</sup>, Атаджанов И. Б.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> — ФГБОУ ВО «Тверской государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России), Тверь, Российская Федерация

<sup>2</sup> — ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва, Российская Федерация

**Аннотация. Актуальность.** Циклический 3',5'-гуанозинмонофосфат является вторичным внутриклеточным мессенджером, который играет ключевую роль во многих физиологических процессах. Количественное определение уровня ц-ГМФ в тканях лабораторных животных является актуальной задачей экспериментальной фармакологии и физиологии. **Цель** — разработка методики количественного определения циклического гуанозинмонофосфата в различных тканях крыс с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. **Методы.** Выделение ц-ГМФ осуществляли путём гомогенизации биоматериала с деионизированной водой. Экстракцию ц-ГМФ из гомогенатов проводили с помощью метанола, в качестве внутреннего стандарта использовали ацикловир. Детектирование ц-ГМФ и ацикловира осуществляли с помощью масс-спектрометра Sciex QTrap 3200MD, хроматографическое разделение проводили с использованием ВЭЖХ Agilent Technologies 1260 Infinity II. В качестве элюента использовали метанол и деионизированную воду. **Результаты.** Детекцию ц-ГМФ осуществляли на основании MRM переходов  $m/z$  346,2/152,1; 346,2/135,1, хроматографическое определение ц-ГМФ проводили в обращённо-фазовом режиме на колонке Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 4,6×100 мм, 2,7 мкм. Время удерживания ц-ГМФ и ацикловира составило 7,85 и 7,45 минут, соответственно, при общей продолжительности хроматографического анализа 12 минут. Аналитический диапазон методики определения ц-ГМФ в гомогенатах составил 0,5–1000,0 пмоль/мл. Для апробации методики был проведён анализ содержания ц-ГМФ в тканях intactных крыс Wistar. **Заключение.** Разработанная биоаналитическая ВЭЖХ-МС/МС-методика количественного определения ц-ГМФ полностью соответствует валидационным требованиям. Метрологические характеристики методики позволяют с высокой точностью оценить содержание ц-ГМФ в различных тканях крыс.

**Ключевые слова:** ВЭЖХ-МС/МС; тандемная масс-спектрометрия; гуанозинмонофосфат; ц-ГМФ

## Для цитирования:

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):28–38. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-3-28-38>

Поступила: 26.06.2023. В доработанном виде: 03.07.2023. Принята к печати: 17.07.2023. Опубликовано: 30.09.2023.

## Quantitative determination of cyclic guanosine monophosphate (c-GMP) in rat tissues using liquid chromatography and tandem mass spectrometry

Nikita S. Popov<sup>1</sup>, Vadim Yu. Balabanyan<sup>2</sup>, Natalya Yu. Kolgina<sup>1</sup>, Gennady A. Petrov<sup>1</sup>, Sergey A. Donskov<sup>1</sup>, Ilyas B. Atadzhanov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> — FSBEI HE Tver SMU MOH Russia, Tver, Russian Federation

<sup>2</sup> — Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

**Abstract. Relevance.** Cyclic 3',5'-guanosine monophosphate is a secondary intracellular messenger that plays a key role in many physiological processes. Quantitative determination of the level of c-GMP in the tissues of laboratory animals is an urgent task of experimental pharmacology and physiology. **Purpose of the study.** Development of a method for the quantitative determination of cyclic guanosine monophosphate in various tissues of rats using high performance liquid chromatography with mass spectrometric detection. **Methods.** The biomaterial was homogenized with deionized water. Extraction of c-GMP from homogenates was performed with methanol, acyclovir was used as an internal standard. Detection of c-GMP and acyclovir was performed using a Sciex QTrap 3200MD mass spectrometer, chromatographic separation was performed using an Agilent Technologies 1260 Infinity II HPLC. The mobile phase was methanol and deionized water. **Results.** Detection of c-GMP was performed by MRM transitions  $m/z$  346.2/152.1; 346.2/135.1, chromatographic determination of c-GMP was performed in reverse phase mode on an Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 4.6×100 mm, 2.7  $\mu$ m column. The retention time of c-GMP and acyclovir was 7.85 and 7.45 minutes, respectively, the total duration of the chromatographic analysis was 12 minutes. The analytical range of the procedure for determining c-GMP in homogenates was 0.5–1000.0 pmol/ml. The content of c-GMP in the tissues of intact Wistar rats was analyzed using the developed method. **Conclusion.** The developed bioanalytical HPLC-MS/MS method for the quantitative determination of c-GMP fully complies with the validation requirements. The metrological characteristics of the method make it possible to estimate the content of c-GMP in various tissues of rats with high accuracy.

**Keywords:** HPLC-MS/MS; tandem mass spectrometry; guanosine monophosphate; c-GMP

## For citations:

Popov NS, Balabanyan VYu, Kolgina NYu, Petrov GA, Donskov SA, Atadzhanov IB. Quantitative determination of cyclic guanosine monophosphate (c-GMP) in rat tissues using liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Farmakokinetika i farmakodinamika* = *Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2023;(3):28–38. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2023-3-28-38>

Received: 26.06.2023. Revision received: 03.07.2023. Accepted: 17.07.2023. Published: 30.09.2023.

## Введение / Introduction

Циклический 3',5'-гуанозинмонофосфат (ц-ГМФ) является вторичным внутриклеточным мессенджером, который играет ключевую роль во многих физиологических процессах [1–3]. Взаимодействие ц-ГМФ с зависимыми протеинкиназами, ионными каналами и фосфодиэстеразами приводит к развитию различных эффектов, включая расслабление гладкой мускулатуры сосудов [4], торможение активности тромбоцитов и макрофагов [5–7], снижение пролиферации фибробластов [8, 9], развитие гиперполяризации рецепторов сетчатки глаза [10, 11] и т. д. Кроме того, установлена роль ц-ГМФ в механизмах памяти и обучения [12], развитии психических расстройств [13, 14] и злокачественных новообразований [15–17], патогенезе воспаления и боли [18–20], образовании половых клеток [21] и др. Таким образом, актуальным является изучение физиологических и патологических процессов, протекающих с участием ц-ГМФ, а также разработка эффективных и безопасных лекарственных средств (ЛС), в основе фармакодинамики которых лежит влияние на обмен данного вещества. Известно, что изменение внутриклеточной концентрации ц-ГМФ является важной составляющей механизма действия таких ЛС, как донаторы оксида азота, ингибиторы фосфодиэстеразы, прямые стимуляторы растворимой гуанилатциклазы, ингибиторы неприлизина.

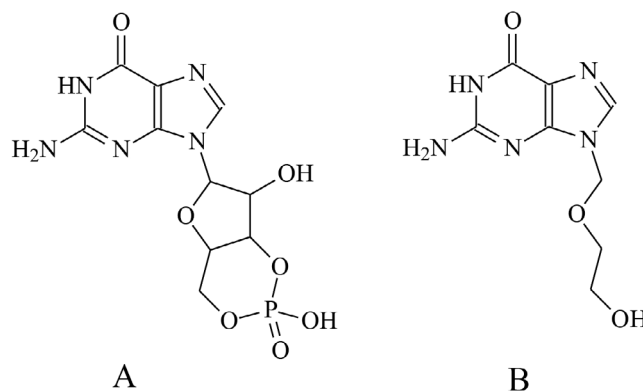
Таким образом, количественное определение уровня ц-ГМФ в тканях лабораторных животных является актуальной задачей экспериментальной фармакологии и физиологии. Сочетание точных и воспроизводимых методик количественного определения биологически активных веществ и экспериментальных моделей патологических состояний является важным инструментом для изучения патогенеза различных заболеваний, а также фармакодинамики, эффективности и безопасности новых ЛС на доклиническом этапе.

Количественный анализ ц-ГМФ в биологических образцах является нетривиальной задачей. Трудность определения данного вещества связана с его низким содержанием в интактных тканях, а также быстрым разрушением под действием фосфодиэстераз. В настоящее время известны такие методы количественного определения ц-ГМФ, как радиоиммуноанализ [22, 23] и высокоэффективная жидкостная хроматография, в том числе с масс-спектрометрическим детектированием. Однако, несмотря на достаточно высокую чувствительность, они имеют ряд недостатков, включая сложную и дорогостоящую процедуру пробоподготовки биоматериала с использованием твёрдофазной экстракции, а также применение меченных изотопами внутренних стандартов [24–26].

**Цель исследования** — разработка методики количественного определения циклического гуанозинмонофосфата в различных тканях крыс с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.

## Материалы и методы / Materials and methods

В процессе разработки методики использовали аналитический стандарт ц-ГМФ (Guanosine 3',5'-cyclic monophosphate, Sigma Aldrich, США, CAS: 7665-99-8). В качестве внутреннего стандарта (IS) применяли ацикловир (Зовиракс, лиофилизат для приготовления раствора для инфузий, ГлаксоСмитКляйн Мэньюфэкчуринг, Италия) (рис. 1).



**Рис. 1.** Структурные формулы 3',5'-гуанозинмонофосфата (А) и ацикловира (В)

**Fig. 1.** Structural formulas of 3',5'-guanosine monophosphate (A) and acyclovir (B)

Исходные растворы ц-ГМФ и IS готовили на деионизированной воде (Milli-Q, сопротивление 18 МОм) в концентрации 4 мкмоль/мл и 25 мг/мл, соответственно. Полученный раствор ц-ГМФ являлся основой для приготовления серии разведений (рабочих растворов) на 50 % метаноле (Химмед, Россия), которые в дальнейшем были и использованы для получения калибровочных стандартов. Из исходного раствора ацикловира готовили экстрагент путём последовательных разведений 100 % метанолом до достижения концентрации 50 нг/мл.

Количественное определение ц-ГМФ проводили с помощью высокоэффективного жидкостного хроматографа 1260 Infinity II (Agilent Technologies, Германия) в обращённо-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). Элюирование осуществляли смесью деионизированной воды и метанола с добавлением 10 мМ муравьиной кислоты в градиентном режиме.

Детектирование компонентов пробы при проведении хроматографического анализа осуществляли с помощью тандемного квадрупольного масс-спектрометра AB Sciex QTrap 3200 MD (Sciex, Сингапур), оснащённого электрораспылительным источником ионов. Подбор оптимальных параметров масс-спектрометрической

детекции проводили при непрерывном введении растворов ц-ГМФ и ацикловира с концентрацией 40 нг/мл (растворитель — 50 % метанол с добавлением 10 мМ муравьиной кислоты) в источник ионов с помощью шприцевого насоса со скоростью 10 мкл/мин. На первом этапе для ц-ГМФ и ацикловира определяли  $m/z$  протонированных молекул, подбирали оптимальные значения потенциала декластеризации (DP) и напряжения на входе в ячейку соударений (CER). 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 ускоряющего напряжения (CXP). Полученные значения были использованы для детекции ц-ГМФ и ацикловира в режиме мониторинга множественных реакций (MRM) и обеспечивали достижение наилучшей чувствительности.

Пробоподготовка тканей крыс включала в себя несколько этапов: гомогенизацию с деионизированной водой, осаждение белков и последующее концентрирование супернатанта. Получение гомогенатов осуществляли следующим образом: в предварительно тарированную на аналитических весах ВЛ-124 (Госметр, Россия) пробирку типа Эппендорф объёмом 2 мл помещали фрагмент ткани, после определения точной массы добавляли деионизированную воду из расчёта 400 мкл на 100 мг ткани с помощью автоматического дозатора переменного объёма Eppendorf Research Plus (Германия), помещали шарик из кварцевого стекла диаметром 5 мм, после чего гомогенизировали на вибромельнице с частотой возвратно-поступательных движений 50 Гц и амплитудой 30 мм в течение 10 минут. Для увеличения выхода ц-ГМФ из биоматериала пробирки дополнительно выдерживали в ультразвуковой ванне (Мегеон, КНР) в течение 10 минут. На следующем этапе пробоподготовки осуществляли экстрагирование ц-ГМФ из полученных гомогенатов с одновременной депротеинизацией. Сравнивали степень извлечения ц-ГМФ из биоматериала при использовании в качестве экстрагента ацетонитрила, метанола, водных растворов сульфосалициловой и трифторуксусной кислот. Гомогенаты с извлекателем перемешивали в термостатируемом шейкере TS-100 C (Biosan, Латвия), удаление осаждённых белковых компонентов осуществляли с помощью центрифуги Sigma 1-14K (Германия). Так как в некоторых видах биоматериала могут наблюдаться низкие значения содержания ц-ГМФ, на следующем этапе пробоподготовки осуществляли концентрирование экстрактов путём высушивания в токе азота с помощью испарителя Miulab NDK200-1N (Китай) с последующим растворением сухого остатка в малом объёме подвижной фазы. Полученные растворы помещали в полиэтиленовые вставки в виалы и использовали для последующего хроматографического анализа.

Первичные данные хромато-масс-спектрометрического анализа обрабатывали с помощью про-

граммного обеспечения (ПО) AB Sciex Analyst 1.3.6, для расчёта значений валидационных параметров использовали ПО Microsoft Office Excel 365.

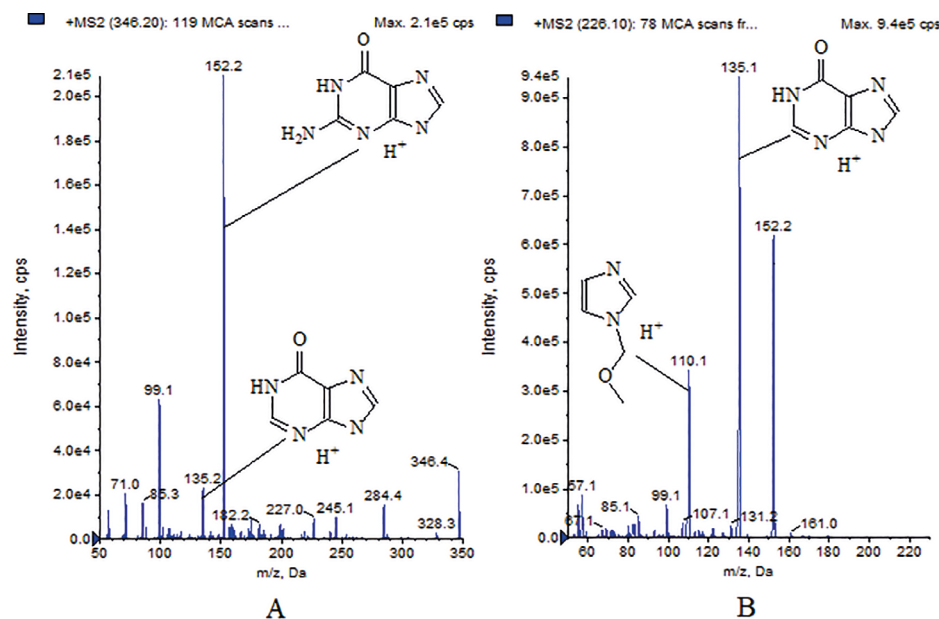
Разработанную методику валидировали по следующим параметрам: селективность, матричный эффект, перенос пробы, линейность аналитического диапазона, нижний предел количественного определения (НПКО), внутри- и межсерийная точность и прецизионность, стабильность на всех этапах анализа.

Для оценки пригодности разработанной методики проводили эксперимент *in vitro* по оценке влияния силденафила на сохранность ц-ГМФ в гомогенатах тромбоцитов крыс, используемых в качестве источника фосфодиэстераз. Крыс ( $N = 6$ ) декапитировали, кровь в объёме 5 мл собирали в пробирки, содержащие цитрат натрия, после чего центрифугировали с помощью центрифуги LMC 4200R (Biosan, Латвия) при 300 g и температуре 10 °C в течение 15 минут. Обогащённую тромбоцитами плазму в объёме 1,5 мл переносили в пробирки, содержащие ЭДТА, и повторно центрифугировали при 1200 g и температуре 10 °C в течение 20 минут. Осадок тромбоцитов вместе с нижним слоем плазмы в объёме 0,5 мл помещали в ручной стеклянный гомогенизатор Поттера–Эльвейма и растирали в течение 90 секунд при одновременном воздействии ультразвука. 180 мкл полученного гомогената переносили в пробирки типа Эппендорф (1,5 мл), добавляли 20 мкл водного раствора ц-ГМФ (500 пмоль/мл), инкубировали в термостатируемом шейкере при температуре 37 °C в течение 30 минут, после чего проводили процедуру пробоподготовки для последующего хроматографического анализа. Сравнивали сохранность ц-ГМФ в гомогенате тромбоцитов, полученном от интактных крыс и животных, которые за 1 час до декапитации получали внутрижелудочно силденафил в дозе 1000 мг/кг. С этой целью проводили ВЭЖХ-МС/МС анализ полученных образцов до и после инкубации.

Разработанную методику использовали для количественной оценки содержания ц-ГМФ в тканях интактных крыс, концентрацию ц-ГМФ рассчитывали на 1 мг белка. С этой целью дополнительно проводили количественный анализ белка в гомогенатах с помощью реагента Total Protein Plus (ELITech Clinical Systems SAS, Франция).

## Результаты / Results

Для ц-ГМФ и ацикловира (IS) были получены масс-спектры первого и второго (рис. 2) порядка, значения  $m/z$  фрагментарных ионов сравнивали с данными литературы [24–26]. Для аналита и внутреннего стандарта были выбраны два характеристических иона-продукта, для которых были подобраны условия детектирования, обеспечивающие максимальный ионный ток (табл. 1).



**Рис. 2.** Масс-спектры второго порядка ц-ГМФ (А) и ацикловира (В) в режиме регистрации положительных ионов

**Fig. 2.** MS/MS-spectra of c-GMP (A) and acyclovir (B) in the positive ion detection mode

Таблица 1

Параметры масс-спектрометрического детектирования ц-ГМФ и ацикловира в режиме MRM

Table 1

Parameters of mass spectrometric detection of c-GMP and acyclovir in MRM mode

| Тип источника ионов             |             |             |       | TurboIonSpray |        |        |        |
|---------------------------------|-------------|-------------|-------|---------------|--------|--------|--------|
| Режим ионизации                 |             |             |       | Положительный |        |        |        |
| Температура источника ионов, °C |             |             |       | 450,0         |        |        |        |
| Напряжение источника ионов, В   |             |             |       | 5 500,0       |        |        |        |
| Давление газа завесы, psi       |             |             |       | 15,0          |        |        |        |
| Давление газа-распылителя, psi  |             |             |       | 35,0          |        |        |        |
| Давление газа-нагревателя, psi  |             |             |       | 40,0          |        |        |        |
|                                 | MRM, $m/z$  | Dwell, мсек | DP, В | EP, В         | CEP, В | CE, эВ | CXP, В |
| ц-ГМФ                           | 346,2/152,1 | 100         | 65,0  | 5,0           | 16,0   | 27,0   | 2,5    |
|                                 | 346,2/135,1 |             |       |               |        | 55,0   | 3,0    |
| Ацикловир (IS)                  | 226,1/135,1 | 100         | 35,0  | 5,0           | 12,0   | 38,0   | 2,5    |
|                                 | 226,1/110,1 |             |       |               |        | 39,0   | 3,3    |

Хроматографическое определение ц-ГМФ осуществляли в обращённо-фазовом режиме. 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 нижний предел количественного определения ц-ГМФ, что не позволяло достичь необходимого уровня чувствительности. Таким образом, элюирование осуществляли смесью деионизированной воды (А)

и метанола (В) с добавлением 10 мМ муравьиной кислоты в градиентном режиме (табл. 2). Время удерживания ц-ГМФ и ацикловира составило 7,85 и 7,45 минут, соответственно, при общей продолжительности хроматографического анализа 12 минут (рис. 3).

По результатам оценки использования различных депротенинирующих агентов при пробоподготовке образцов гомогенатов тканей крыс было установлено, что использование метанола характеризуется наибольшими значениями степени извлечения ц-ГМФ, при этом эффективно удаляются мешающие компо-

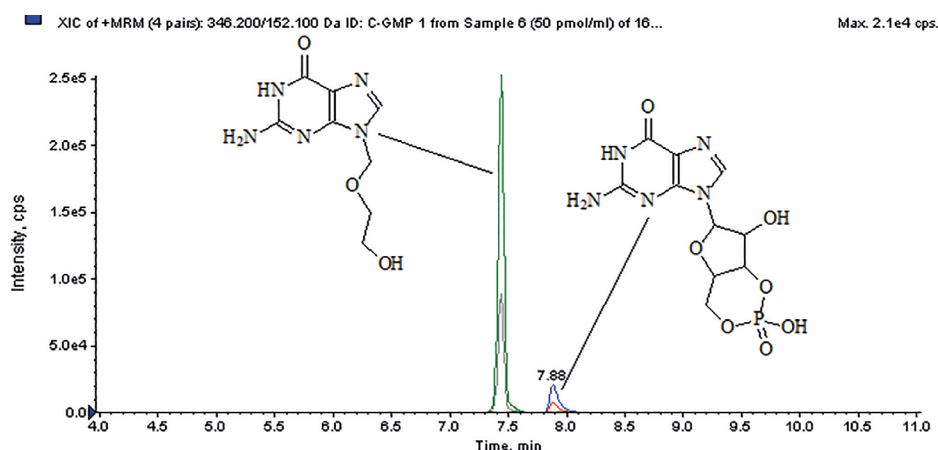
Таблица 2

## ВЭЖХ-параметры определения ц-ГМФ

Table 2

## HPLC parameters for the determination of c-GMP

|                            |                                                      |                          |     |     |
|----------------------------|------------------------------------------------------|--------------------------|-----|-----|
| Хроматографическая колонка | InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 4,6×100 мм, 2,7 мкм |                          |     |     |
| Элюент А                   | Деионизированная вода + 10 мМ муравьиной кислоты     |                          |     |     |
| Элюент В                   | Метанол + 10 мМ муравьиной кислоты                   |                          |     |     |
| Программа градиента        | Время, мин                                           | Скорость потока, мкл/мин | % А | % В |
|                            | 0,0                                                  | 400                      | 95  | 5   |
|                            | 2,5                                                  |                          | 95  | 5   |
|                            | 4,0                                                  |                          | 5   | 95  |
|                            | 8,0                                                  |                          | 5   | 95  |
|                            | 8,01                                                 |                          | 98  | 2   |
|                            | 12,0                                                 |                          | 98  | 2   |
| Температура колонки, °С    | 30                                                   |                          |     |     |
| Объём ввода, мкл           | 10                                                   |                          |     |     |
| Общее время анализа, мин   | 12                                                   |                          |     |     |
| Промывка инжектора         | 5 секунд, 25 % водный раствор метанола               |                          |     |     |



**Рис. 3.** Хромограмма стандартного образца с концентрацией ц-ГМФ 50 пмоль/мл

**Fig. 3.** Chromatogram of a standard sample with a concentration of c-GMP 50 pmol/ml  
*Примечания:* подвижная фаза — метанол и деионизированная вода с добавлением 10 мМ муравьиной кислоты; режим элюирования — градиентный; хроматографическая колонка — InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 4,6×100 мм, 2,7 мкм; температура колонки — 30 °С; аликвота — 10 мкл.

*Notes:* mobile phase — methanol and deionized water with the addition of 10 mM formic acid; elution mode — gradient; chromatographic column — InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 4.6×100 mm, 2.7 μm; temperature columns — 30 °C; aliquot — 10 μl.

ненты матрицы. Пробоподготовка для гомогенатов всех тканей была выполнена следующим образом: в пробирку Эппендорфа объёмом 1,5 мл с помощью автоматического дозатора вносили 100 мкл соответствующего гомогената, добавляли 400 мкл раствора ацикловира (50 нг/мл) в метаноле, выдерживали в термостатируемом шейкере при температуре 4 °С и частоте колебаний 1 400 в 1 минуту в течение 5 минут, после чего надосадочную жидкость отделяли центрифугированием при ускорении 16000 g и температуре 4 °С в течение 15 минут. 400 мкл полученного супернатанта переносили в пробирки Эппендорфа объёмом 0,5 мл и высушивали в токе азота при комнатной температуре.

Сухой остаток растворяли в 50 мкл 5 % метанола, полученный раствор переносили в полиэтиленовые вставки для хроматографических виал и использовали для проведения ВЭЖХ-МС/МС анализа.

Для определения метрологических характеристик разрабатываемой методики была приготовлена и проанализирована серия стандартных образцов с содержанием ц-ГМФ: 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 50,0; 100,0; 500,0 и 1000,0 пмоль/мл в пересчёте на гомогенат. По причине отсутствия свободной от ц-ГМФ биологической матрицы требуется доказательство возможности использования деионизированной воды в качестве её заменителя. С этой целью сравнивали коэффициенты

наклона калибровочных кривых, полученных по результатам анализа серии стандартных образцов, приготовленных на воде и на соответствующих гомогенатах. Кроме этого, калибровочную кривую, полученную по результатам анализа образцов, приготовленных на деионизированной воде, использовали для определения содержания ц-ГМФ в стандартных образцах, приготовленных на гомогенатах. Определяли разность между установленной по калибровочной зависимости концентрацией ц-ГМФ и концентрацией стандартных растворов с добавкой без учёта эндогенного уровня аналита [27]. Стандартные растворы получали путём добавления к 90 мкл деионизированной воды (или гомогената ткани) 10 мкл соответствующего 10-кратного рабочего раствора ц-ГМФ, после чего проводили пробоподготовку полученных образцов по вышеописанной методике [19].

По результатам эксперимента со стандартным добавлением было установлено, что значения коэффициента вариации разности концентраций для гомогенатов тканей крыс на протяжении всего аналитического диапазона составили от 5,8 до 11,4 %. Лишь для гомогената почек величина относительного стандартного отклонения была приближена к 15 %. Значения отношения коэффициентов наклона калибровочных кривых, полученных по результатам анализа образцов на деионизированной воде и гомогенатах тканей, составили от 0,912 до 1,08. Таким образом, использование калибровочных стандартных образцов, приготовленных на деионизированной воде, не будет существенно отражаться на правильности определения концентрации ц-ГМФ в биологических объектах.

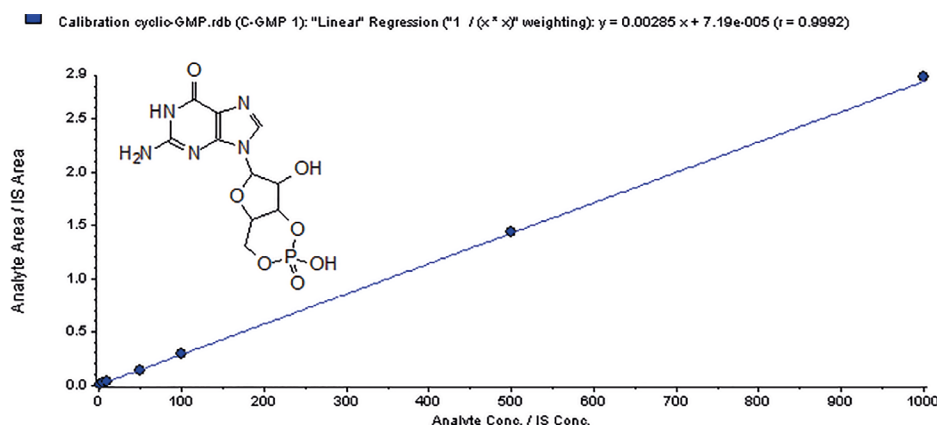
Оценку селективности методики проводили путём сравнения отношений площадей хроматографических пиков двух ионов-продуктов ц-ГМФ и ацикловира

при анализе образцов на деионизированной воде и гомогенатах тканей. Было установлено, что на всех уровнях концентраций ц-ГМФ этот показатель не превышал 5 %, а для внутреннего стандарта (ацикловира) эти значения составили менее 1 %, что подтверждает высокую селективность разработанной методики.

На основании результатов анализа серии стандартных образцов была построена калибровочная кривая, отражающая зависимость отношения площади пика ц-ГМФ к площади пика ацикловира от концентрации ц-ГМФ в стандартном образце (рис. 4). Калибровочная зависимость представлена в виде уравнения линейной регрессии  $y = 0,00285x + 0,0000719$  (нормирование  $1/x^2$ ), коэффициент корреляции при этом составил 0,9992 (табл. 3).

Так как в природе отсутствует свободная от ц-ГМФ биологическая матрица, нижний предел количественного определения (НПКО) для ц-ГМФ оценивали по результатам хроматографического анализа аналитических стандартов, приготовленных на деионизированной воде. За НПКО принимали минимальное условное содержание ц-ГМФ в 1 мл гомогената ткани, которое может быть определено со значениями относительного стандартного отклонения и относительной погрешности не более 20 %, при этом отношение «сигнал—шум» на хроматограмме должно быть не менее 5:1. Значение НПКО для ц-ГМФ составило 0,5 пмоль/мл.

Для оценки переноса веществ во время хроматографического анализа сравнивали хроматограммы холостых проб, которые были проанализированы после шестикратного ввода образца с высокой концентрацией ц-ГМФ, с хроматограммами образцов с содержанием ц-ГМФ на уровне НПКО. По результатам анализа было установлено, что отношения площадей пиков в холостых образцах к площадям пиков в об-



**Рис. 4.** Калибровочная кривая для количественного определения ц-ГМФ

**Fig. 4.** Calibration curve for the quantitative determination of c-GMP

*Примечания:* по горизонтальной оси представлена концентрация ц-ГМФ в гомогенате (пмоль/мл); по вертикальной оси — отношение площади хроматографического пика ц-ГМФ к площади пика IS — ацикловира.

*Notes:* the horizontal axis shows the concentration of c-GMP in the homogenate (pmol/ml), the vertical axis shows the ratio of the area of the chromatographic peak of c-GMP to the peak area of IS — acyclovir.

Таблица 3

Валидационные характеристики методики определения ц-ГМФ в гомогенатах тканей крыс

Table 3

Validation characteristics of the method for determining c-GMP in rat tissue homogenates

| Аналитический диапазон, пмоль/мл                  |                      | 0,5 – 1000,0               |                      |                      |
|---------------------------------------------------|----------------------|----------------------------|----------------------|----------------------|
| Уравнение регрессии                               |                      | $y = 0,00285x + 0,0000719$ |                      |                      |
| $r^2$                                             |                      | 0,9992                     |                      |                      |
| Образец                                           | НПКО<br>0,5 пмоль/мл | НК<br>45,0 пмоль/мл        | СК<br>450,0 пмоль/мл | ВК<br>900,0 пмоль/мл |
| Точность и прецизионность, серия 1 (Inter-day)    |                      |                            |                      |                      |
| Измеренная концентрация, пмоль/мл, mean±SD        | 0,422±0,054          | 41,44±1,76                 | 457,8±27,5           | 871,4±19,1           |
| Точность, %                                       | 84,4                 | 92,1                       | 101,7                | 96,8                 |
| CV, %                                             | 12,8                 | 4,3                        | 6,0                  | 2,2                  |
| Точность и прецизионность, серия 2 (Inter-day)    |                      |                            |                      |                      |
| Измеренная концентрация, пмоль/мл, mean±SD        | 0,410±0,039          | 42,06±3,64                 | 477,8±10,2           | 910,4±27,1           |
| Точность, %                                       | 82,0                 | 93,5                       | 106,2                | 101,2                |
| CV, %                                             | 9,4                  | 8,6                        | 2,1                  | 3,0                  |
| Точность и прецизионность, серия 3 (Inter-day)    |                      |                            |                      |                      |
| Измеренная концентрация, пмоль/мл, mean±SD        | 0,412±0,044          | 39,92±1,87                 | 431,0±19,2           | 872,2±35,8           |
| Точность, %                                       | 82,4                 | 88,7                       | 95,8                 | 96,9                 |
| CV, %                                             | 10,6                 | 4,7                        | 4,5                  | 4,1                  |
| Межсерийная точность и прецизионность (Intra-day) |                      |                            |                      |                      |
| Измеренная концентрация, пмоль/мл, mean±SD        | 0,415±0,043          | 41,14±2,56                 | 455,5±27,3           | 884,7±32,1           |
| Точность, %                                       | 82,9                 | 91,4                       | 101,2                | 98,3                 |
| CV, %                                             | 10,3                 | 6,2                        | 6,0                  | 3,6                  |

разцах НПКО были ниже максимально допустимого уровня (20 % для аналита и 5 % для IS).

Точность и прецизионность методики оценивали в трёх сериях путём анализа 5 контрольных образцов для четырёх уровней концентраций ц-ГМФ: НПКО, низкая концентрация (НК), средняя концентрация (СК), высокая концентрация (ВК). Точность была выражена в процентах — как отношение измеренной концентрации в контрольных образцах к номинальному содержанию ц-ГМФ (Е). Прецизионность определяли по коэффициенту вариации (CV) результатов пятикратного определения концентрации ц-ГМФ. 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 табл. 3.

Результаты оценки стабильности подтвердили сохранность исходных и рабочих растворов ц-ГМФ в течение 1 месяца. Контрольные образцы, получен-

ные путём добавления к гомогенатам тканей рабочих растворов ц-ГМФ до достижения высоких и низких концентраций, были стабильны в течение 1 часа при комнатной температуре. При повторном анализе таких образцов площадь хроматографических пиков не отличалась от первоначальных значений более чем на 15 %. Более длительное хранение приводило к потере содержания ц-ГМФ, что свидетельствует о необходимости немедленного проведения процедуры пробоподготовки или замораживания образцов. Так, хранение образцов при -80 °С позволило сохранить уровень ц-ГМФ в течение одной недели. Оценка пост-препаративной стабильности подтвердила сохранность готовых для хроматографического анализа проб в течение суток (максимальное время анализа всех образцов, находящихся в автосамплере хроматографа). Результаты исследования стабильности образцов после 3 циклов заморозки—разморозки показали значительную потерю содержания ц-ГМФ как для низких, так и для высоких концентраций, площадь

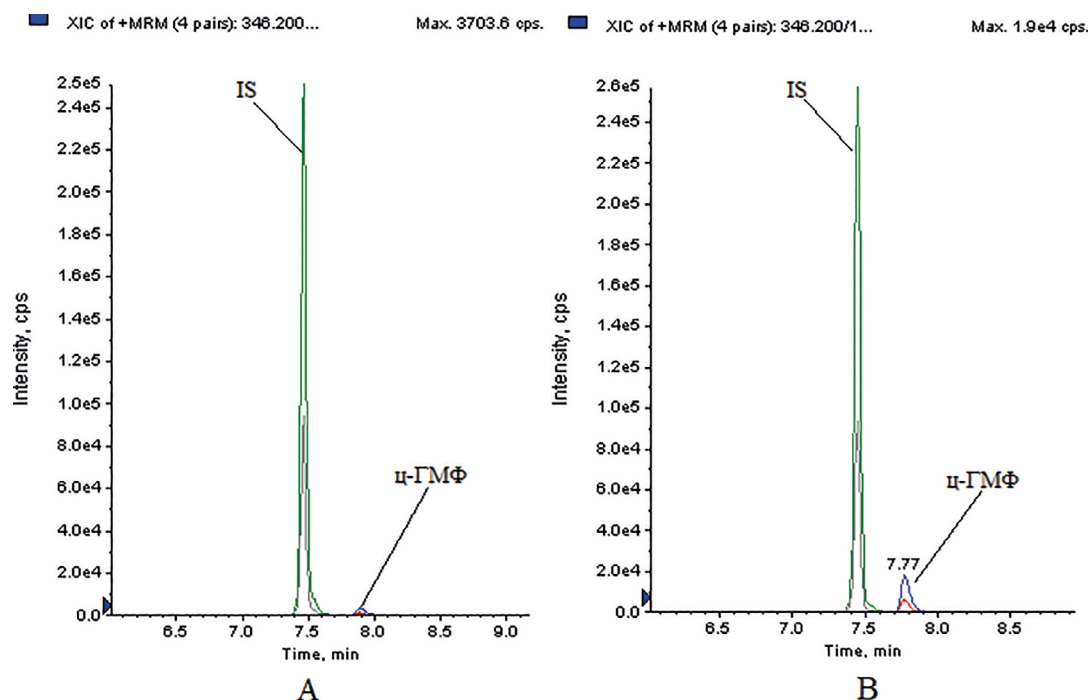
хроматографических пиков при повторном анализе таких образцов составляла от 20 до 34 % от первоначальных значений. Таким образом, достаточная точность определения ц-ГМФ в биологическом материале может быть обеспечена незамедлительным приготовлением гомогенатов из полученных фрагментов тканей с последующей процедурой пробоподготовки. В случае отсутствия возможности немедленно произвести депротеинизацию полученных гомогенатов, последние должны быть заморожены.

Апробацию разработанной методики проводили *in vitro* путём определения сохранности ц-ГМФ в гомогенизированной обогащённой тромбоцитами плазме крыс, которые заранее получали внутривенно силденафил в дозе 1000 мг/кг. Так, было установлено, что после инкубации образцов, приготовленных с использованием интактной плазмы, содержание

ц-ГМФ составило в среднем ( $p < 0,05$ ) 17,6 % от первоначальных значений. Использование плазмы крыс, получавших силденафил, при прочих равных условиях позволило увеличить сохранность ц-ГМФ в образцах в среднем ( $p < 0,05$ ) до 91,2 %. Примеры хроматограмм исследованных образцов приведены на рис. 5.

### Обсуждение / Discussion

Разработанная методика была использована для анализа содержания ц-ГМФ в тканях интактных крыс Wistar ( $N = 5$ ), содержащихся в виварии ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России и выведенных из эксперимента в утренние часы путём декапитации. Результаты определения ц-ГМФ представлены в пересчёте на 1 мг белка (табл. 4) и сопоставимы с данными, полученными другими авторами [28–30].



**Рис. 5.** Фрагменты хроматограмм образцов обогащённой тромбоцитами плазмы крыс с добавлением ц-ГМФ до достижения концентрации 50 пмоль/мл после инкубации в течение 30 минут при температуре 37 °С.

А — интактная плазма; В — плазма крыс, получавших силденафил

**Fig. 5.** Chromatogram fragments of platelet-rich plasma samples from rats with c-GMP concentration of 50 pmol/ml after incubation for 30 minutes at a temperature of 37 °C.

А — intact plasma; В — rat plasma with sildenafil

Таблица 4

Содержание ц-ГМФ в тканях интактных крыс Wistar

Table 4

Content of c-GMP in tissues of intact Wistar rats

| Ткань                                          | Фронтальная кора   | Мозжечок            | Сердце             | Аорта              | Печень              | Почки              | Лёгкие             |
|------------------------------------------------|--------------------|---------------------|--------------------|--------------------|---------------------|--------------------|--------------------|
| Содержание ц-ГМФ, пмоль/мг белка ( $M \pm m$ ) | 3,96<br>$\pm 0,29$ | 20,40<br>$\pm 2,29$ | 1,87<br>$\pm 0,60$ | 2,36<br>$\pm 0,52$ | 24,14<br>$\pm 3,28$ | 1,74<br>$\pm 0,18$ | 1,99<br>$\pm 0,22$ |

**Ограничения исследования / Limitations of the study**

По мнению авторов, разработанная методика количественного определения ц-ГМФ в тканях крыс имеет ряд особенностей, ограничивающих её использование. К ним можно отнести малую распространённость масс-селективных детекторов для ВЭЖХ, а также отсутствие возможности оценивать уровень ц-ГМФ в динамике у одних и тех же лабораторных животных.

**Заключение / Conclusion**

Разработанная биоаналитическая ВЭЖХ-МС/МС-методика количественного определения ц-ГМФ полностью соответствует валидационным требованиям. Метрологические характеристики методики позволяют с высокой точностью оценить содержание ц-ГМФ в различных тканях крыс, что несомненно является актуальным и востребованным в исследовании патологических процессов и механизма действия фармакологических средств.

**ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ / ADDITIONAL INFORMATION**

**Конфликт интересов.** У авторов отсутствует какой-либо конфликт интересов.

**Conflict of interest.** The authors do not have any conflict of interest.

**Участие авторов.** Попов Н. С. — осуществлял разработку и валидацию биоаналитической методики; Балабаньян В. Ю. — отвечал за организационную часть исследования; Колгина Н. Ю., Петров Г. А. — проводили анализ литературных источников и статистическую обработку полученных результатов; Донсков С. А., Атаджанов И. Б. — осуществляли выделение и подготовку биологического материала; все авторы участвовали в обсуждении полученных результатов.

**Participation of authors.** Popov NS — carried out the development and validation of the bioanalytical method; Balabanyan VYu — was responsible for the organizational part of the study; Kolgina NYu, Petrov GA — carried out the analysis of literary sources and statistical processing of the obtained results; Donskov SA, Atajanov IB — carried out the isolation and preparation of biological material; all authors participated in the discussion of the obtained results

**СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS**

**Попов Никита Сергеевич**

*Автор, ответственный за переписку*

e-mail: ns.popov@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1792-7414>

SPIN-код: 1974-7300

к. фарм. н., зав. научно-исследовательской лабораторией, доцент кафедры фармакологии и клинической фармакологии, ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России, Тверь, Российская Федерация

**Nikita S. Popov**

*Corresponding author*

e-mail: ns.popov@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1792-7414>

SPIN code: 1974-7300

PhD, Cand. Sci. Pharm., Head of Research Laboratory, Associate Professor, Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology, FSBEI HE Tver SMU MOH Russia, Tver, Russian Federation

**Балабаньян Вадим Юрьевич**

e-mail: bal.pharm@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5744-7060>

SPIN-код: 7351-7328

д. фарм. н., доцент, в. н. с., лаборатория трансляционной медицины, факультет фундаментальной медицины, МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Российская Федерация

**Vadim Yu. Balabanyan**

e-mail: bal.pharm@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5744-7060>

SPIN code: 7351-7328

Dr. Sci. (Pharm), Associate Professor, Leading Researcher, Laboratory of Translational Medicine, Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov MSU, Moscow, Russian Federation

**Колгина Наталья Юрьевна**

e-mail: natali\_jbk@mail.ru

SPIN-код: 7231-0033

к. м. н., заведующая кафедрой фармакологии и клинической фармакологии, ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России, Тверь, Российская Федерация

**Natalya Yu. Kolgina**

e-mail: natali\_jbk@mail.ru

SPIN code: 7231-0033

PhD, Cand. Sci. Med., Head of Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology, FSBEI HE Tver SMU MOH Russia, Tver, Russian Federation

**Петров Геннадий Анатольевич**

e-mail: petrov\_gennadiy@mail.ru

SPIN-код: 3904-3405

к. м. н., доцент кафедры фармакологии и клинической фармакологии, ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России, Тверь, Российская Федерация

**Gennady A. Petrov**

e-mail: petrov\_gennadiy@mail.ru

SPIN code: 3904-3405

PhD, Cand. Sci. Med., Associate Professor, Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology, FSBEI HE Tver SMU MOH Russia, Tver, Russian Federation

**Донсков Сергей Александрович**

e-mail: donskov\_s@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3780-5534>

SPIN-код: 1026-7460

к. с.-х. н., доцент кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России, Тверь, Российская Федерация

**Sergey A. Donskov**

e-mail: donskov\_s@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-3780-5534>

SPIN code: 1026-7460

PhD, Cand. Sci. Agricult., Associate Professor, Department of Histology, Embryology and Cytology, FSBEI HE Tver SMU MOH Russia, Tver, Russian Federation

**Атаджанов Ильяс Борисович**

e-mail: atadzanov.ilyas@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1995-2661>

препаратор кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии, ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России, Тверь, Российская Федерация

**Ilyas B. Atadzhanov**

e-mail: atadzanov.ilyas@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1995-2661>

preparator of the Department of Histology, Embryology and Cytology, FSBEI HE Tver SMU MOH Russia, Tver, Russian Federation

**Список литературы / References**

1. Кобалава Ж.Д., Лазарев П.В. Значение сигнального пути “оксид азота — растворимая гуанилатциклаза — циклический гуанозинмонофосфат” в патогенезе сердечной недостаточности и поиске новых терапевтических мишеней. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2021;20(6):3035. [Kobalava ZD, Lazarev PV. Nitric oxide — soluble guanylate cyclase — cyclic guanosine monophosphate signaling pathway in the pathogenesis of heart failure and search for novel therapeutic targets. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2021;20(6):3035. (In Russ.)]. DOI: 10.15829/1728-8800-2021-3035.
2. Jehle A, Garaschuk O. The Interplay between cGMP and Calcium Signaling in Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci*. 2022 Jun 24;23(13):7048. DOI: 10.3390/ijms23137048.
3. Gao Y. Biology of vascular smooth muscle: vasoconstriction and dilation. *New York, NY, USA: Springer*. 2017;8:105. DOI: 10.1007/978-981-10-4810-4.
4. Lincoln TM. Cyclic GMP and mechanisms of vasodilation. *Pharmacol Ther*. 1989;41(3):479-502. DOI: 10.1016/0163-7258(89)90127-7.
5. Gambaryan S. The Role of NO/sGC/cGMP/PKG Signaling Pathway in Regulation of Platelet Function. *Cells*. 2022 Nov 21;11(22):3704. DOI: 10.3390/cells11223704.
6. Li Z, Liang Y, Zhang G, et al. An important stimulatory role for the cGMP-dependent protein kinase II in platelet activation, *in vivo* thrombosis and haemostasis. *Authorea*. 2020. DOI: 10.22541/au.160802063.39198387/v1.

7. Prasad H, Mathew JKK, Visweswariah SS. Receptor Guanylyl Cyclase C and Cyclic GMP in Health and Disease: Perspectives and Therapeutic Opportunities. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022 Jun 29;13:911459. DOI: 10.3389/fendo.2022.911459.
8. Qin L, Zang M, Xu Y, et al. Chlorogenic Acid Alleviates Hyperglycemia-Induced Cardiac Fibrosis through Activation of the NO/cGMP/PKG Pathway in Cardiac Fibroblasts. *Mol Nutr Food Res*. 2021 Jan;65(2):e2000810. DOI: 10.1002/mnfr.202000810.
9. Chen Y, Zheng Y, Iyer SR, et al. C53: A novel particulate guanylyl cyclase B receptor activator that has sustained activity *in vivo* with anti-fibrotic actions in human cardiac and renal fibroblasts. *J Mol Cell Cardiol*. 2019 May;130:140-150. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2019.03.024.
10. Cantó A, Martínez-González J, López-Pedraja R, et al. Effect of nitric oxide inhibitors in retinitis pigmentosa. In *Nitric Oxide in Health and Disease*. Academic Press. 2023;289-303. DOI: 10.1016/B978-0-443-13342-8.00001-6.
11. Wucherpfennig S, Haq W, Popp V, et al. Using cGMP analogues to modulate photoreceptor light sensitivity: Perspectives for the treatment of retinal degeneration. *BioRxiv*. 2022;02. DOI: 10.1101/2022.02.07.478618.
12. Rosenbrock H, Giovannini R, Schänzle G, et al. The Novel Phosphodiesterase 9A Inhibitor BI 409306 Increases Cyclic Guanosine Monophosphate Levels in the Brain, Promotes Synaptic Plasticity, and Enhances Memory Function in Rodents. *J Pharmacol Exp Ther*. 2019 Dec;371(3):633-641. DOI: 10.1124/jpet.119.260059.

13. Sani G, Kotzalidis GD, Fiaschè F, et al. Second messengers and their importance for novel drug treatments of patients with bipolar disorder. *Int Rev Psychiatry*. 2022 Nov-Dec;34(7-8):736–752. DOI: 10.1080/09540261.2022.2119073.
14. Jehle A, Garaschuk O. The Interplay between cGMP and Calcium Signaling in Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci*. 2022 Jun 24;23(13):7048. DOI: 10.3390/ijms23137048.
15. Kashgari FK, Ravna A, Sager G, Lyså R, Enyedy I, Dietrichs ES. Identification and experimental confirmation of novel cGMP efflux inhibitors by virtual ligand screening of vardenafil-analogues. *Biomed Pharmacother*. 2020 Jun;126:110109. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.110109. Epub 2020 Mar 28. Erratum in: *Biomed Pharmacother*. 2022 Aug;152:113228.
16. Li M, Ji Y. Propranolol Inhibits the Growth of Cervical Cancer Cells by Inhibiting Cyclic Guanosine Monophosphate/Protein Kinase G (cGMP/PKG) Pathway. *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*. 2022; 12(2):422–426. DOI: 10.1166/jbt.2022.2916.
17. Di Iorio P, Ronci M, Giuliani P, et al. Pros and Cons of Pharmacological Manipulation of cGMP-PDEs in the Prevention and Treatment of Breast Cancer. *Int J Mol Sci*. 2021 Dec 27;23(1):262. DOI: 10.3390/ijms23010262.
18. Wang Z, Ma D, Xi Z. Cyclic dinucleotides: a new-generation drug for immune therapy. *Nucleic Acids in Medicinal Chemistry and Chemical Biology: Drug Development and Clinical Applications*. 2023;41–83. DOI: 10.1002/9781119692799.ch2.
19. Tan J, Wu B, Chen T, et al. Synthesis and Pharmacological Evaluation of Tetrahydro- $\gamma$ -carboline Derivatives as Potent Anti-inflammatory Agents Targeting Cyclic GMP-AMP Synthase. *J Med Chem*. 2021 Jun 10;64(11):7667–7690. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.1c00398.
20. Fakhri S, Ahmadvour Y, Rezaei H, et al. The antinociceptive mechanisms of melatonin: role of L-arginine/nitric oxide/cyclic GMP/KATP channel signaling pathway. *Behav Pharmacol*. 2020 Dec;31(8):728–737. DOI: 10.1097/FBP.0000000000000579.
21. Baena V, Owen CM, Uliasz TF, et al. Cellular Heterogeneity of the Luteinizing Hormone Receptor and Its Significance for Cyclic GMP Signaling in Mouse Preovulatory Follicles. *Endocrinology*. 2020 Jul 1;161(7):bqaa074. DOI: 10.1210/endo/bqaa074.
22. Vente JD, Garssen J, Tilders FJ, et al. Single cell quantitative immunocytochemistry of cyclic GMP in the superior cervical ganglion of the rat. *Brain Res*. 1987 May 12;411(1):120–128. DOI: 10.1016/0006-8993(87)90688-3.
23. Yamamoto I, Tsuji J, Takai T, Fujimoto M. Double antibody enzyme immunoassay for the quantitation of adenosine 3', 5' -cyclic monophosphate (cyclic AMP) and guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate (cyclic GMP) in tissue and plasma. *J Immunoassay*. 1982;3(2):173–196. DOI: 10.1080/15321818208056994.
24. Van Damme T, Zhang Y, Lynen F, Sandra P. Determination of cyclic guanosine- and cyclic adenosine monophosphate (cGMP and cAMP) in human plasma and animal tissues by solid phase extraction on silica and liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2012 Nov 15;909:14–21. DOI: 10.1016/j.jchromb.2012.10.002.
25. Martens-Lobenhoffer J, Dautz C, Bode-Böger SM. Improved method for the determination of cyclic guanosine monophosphate (cGMP) in human plasma by LC-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2010 Feb 1;878(3-4):487–491. DOI: 10.1016/j.jchromb.2009.12.009.
26. Lorenzetti R, Lilla S, Donato JL, de Nucci G. Simultaneous quantification of GMP, AMP, cyclic GMP and cyclic AMP by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2007 Nov 1;859(1):37–41. DOI: 10.1016/j.jchromb.2007.09.008.
27. Minkler PE, Stoll MS, Ingalls ST, et al. Quantification of carnitine and acylcarnitines in biological matrices by HPLC electrospray ionization-mass spectrometry. *Clin Chem*. 2008 Sep;54(9):1451–1462. DOI: 10.1373/jclinchem.2007.099226.
28. Kinscherf DA, Chang MM, Rubin EH, et al. Comparison of the effects of depolarizing agents and neurotransmitters on regional CNS cyclic GMP levels in various animals. *J Neurochem*. 1976 Mar;26(3):527–530. DOI: 10.1111/j.1471-4159.1976.tb01506.x.
29. Veerappan R, Malarvili T. Chrysin Pretreatment Improves Angiotensin System, cGMP Concentration in L-NAME Induced Hypertensive Rats. *Indian J Clin Biochem*. 2019 Jul;34(3):288–295. DOI: 10.1007/s12291-018-0761-y.
30. Bojunga J, Dresar-Mayert B, Usadel KH, et al. Antioxidative treatment reverses imbalances of nitric oxide synthase isoform expression and attenuates tissue-cGMP activation in diabetic rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Apr 9;316(3):771–780. DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.02.110.