

# Роль гиперпродукции оксида азота в развитии болезни Альцгеймера и возможность ее предупреждения с помощью адаптации к гипоксии

Манухина Е.Б.<sup>1,3</sup>, Горячева А.В.<sup>1</sup>, Малышев И.Ю.<sup>1,2</sup>, Дауни Г.Ф.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> — ФГБУ НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН, Москва, Россия

<sup>2</sup> — Московский Государственный медико-стоматологический Университет, Москва, Россия

<sup>3</sup> — Центр медицинских наук Университета Северного Техаса, Форт-Уэрт, США

Избыточная продукция оксида азота (NO) в мозге играет важную роль в развитии и прогрессировании нейродегенеративных заболеваний, включая болезнь Альцгеймера (БА). Прямые нейротоксические эффекты избытка NO обусловлены митохондриальной дисфункцией с истощением резервов АТФ, апоптозом нервных клеток, эксайтотоксичностью, нитрованием или окислением белков вследствие NO-зависимого образования активных форм азота и кислорода, а также повреждением и дисфункцией клеток микрососудов с последующим нарушением мозгового кровообращения. Недавние исследования показали, что адаптация к периодической гипоксии способна предупреждать гиперпродукцию NO, нитрование белков и увеличение экспрессии всех изоформ NO-синтазы в мозге крыс с экспериментальной БА. Предупреждение гиперпродукции NO сопровождается ограничением когнитивных нарушений, уменьшением потери нейронов мозга и увеличением плотности церебральной сосудистой сети. Возможные механизмы предупреждения гиперпродукции NO с помощью адаптации к гипоксии включают: 1) ограничение продукции NO за счет дефицита кислорода как субстрата NO-синтазы, 2) умеренное повышение уровня NO, которое обеспечивает ингибирование NO-синтазы по механизму отрицательной обратной связи, 3) модулирование кислородом ингибирующего механизма отрицательной обратной связи, 4) ограничение оксидативного стресса и 5) связывание избытка NO в депо. Таким образом, методы адаптационной медицины могут использоваться в качестве стратегии активации эндогенных протекторных механизмов для предупреждения или замедления прогрессирования БА.

**Ключевые слова:** адаптация к гипоксии, бета-амилоид, болезнь Альцгеймера, оксид азота, нейродегенерация, мозговое кровообращение, депо NO

## Введение

Оксид азота (NO) — это маленькая биоактивная молекула, которая образуется в организме практически всех млекопитающих путем пятиэлектронного окисления конечной гуанидиновой группы L-аргинаина. Эту реакцию катализирует фермент NO-синтаза (NOS) при участии флавинов и тетрагидробиоптерина в качестве кофакторов. Для образования NO требуются также кислород и НАДФН. Семейство NOS состоит из трех изоформ: нейрональной (nNOS), индуцибельной NOS (iNOS) и эндотелиальной (eNOS). nNOS и eNOS экспрессируются конститутивно, в первую очередь, в нейронах и эндотелиальных клетках, соответственно, продуцируя NO в небольших количествах в ответ на Ca<sup>2+</sup>-зависимое связывание с кальмодулином. Поэтому факторы, повышающие уровень внутриклеточного Ca<sup>2+</sup>, такие, как ацетилхолин, брадикинин, АТФ, серотонин и тромбин, в течение нескольких секунд стимулируют синтез NO nNOS и eNOS. В отличие от nNOS и eNOS, которые синтезируют NO в наномолярных количествах, iNOS продуцирует NO в микромолярных количествах, независимо от уровня Ca<sup>2+</sup> [47].

В покое в эндотелиальных клетках eNOS находится в состоянии тонического ингибирования за счет S-нитрозилирования цистеина-94 и цистеина-99 [43]. iNOS регулируется преимущественно на уровне транскрипционных и посттранскрипционных механизмов [94]. NO прямо ингибирует iNOS посредством механизма отрицательной обратной связи, связываясь с гемовой группой iNOS. Ак-

тивность iNOS практически не регулируется. После индукции iNOS непрерывно продуцирует NO до деградации фермента [102].

Гиперпродукция NO может быть обусловлена повышенной активностью nNOS в нейронах, iNOS в макрофагах, микроглии, астроцитах и сосудистых гладкомышечных клетках, а также избыточной активацией eNOS в эндотелии коронарных, мозговых и периферических сосудов [110]. Наиболее агрессивным производным NO является пероксинитрит — мощный окислитель и нитратирующий агент, который образуется путем необратимого соединения NO и супероксид-аниона. Такие производные NO вместе с избытком самого NO химически модифицируют биомолекулы, в том числе белки, липиды и ДНК, могут инициировать каскады перекисного окисления липидов [82] и апоптоза [83], вызывать разрывы цепей ДНК [115] и инактивировать дыхательные комплексы митохондрий [96]. Эти процессы приводят к нарушению целостности мембран, повреждению структурных и сократительных белков, инактивации ферментов и, в конечном счете, необратимым, летальным повреждениям клеток. Именно эти механизмы обуславливают участие NO в патогенезе многих заболеваний человека, включая опухолевый рост, астму, артрит, нейродегенеративные заболевания, инфаркт миокарда, инсульт, шок и другие [71].

Во многих исследованиях было доказано, что адаптация к периодической гипоксии способна защищать организм от гиперпродукции NO. Так, 8-дневная адаптация к периодической гипобарической гипоксии предупреждала

гиперпродукцию NO в мозге крыс и существенно увеличивала их выживаемость на «высоте» 11000 м [84]. В этом исследовании ингибирование NOS или связывание NO с помощью ловушек оказывало такой же защитный эффект, как и адаптация. Адаптация к гипоксии ограничивала падение артериального давления и чрезмерное усиление эндотелийзависимого расслабления сосудов, сопровождавшие экспериментальный инфаркт миокарда у крыс [89]. При ишемическом и реперфузионном повреждении изолированного сердца крысы и собаки адаптация к периодической нормобарической гипоксии эффективно предупреждала ишемические аритмии и уменьшала площадь инфаркта [1, 116]. Эти защитные эффекты сопровождалась предупреждением гиперпродукции NO и накоплением 3-нитротирозина (3-НТ) — показателя степени нитрования белков и маркера пероксинитрита [9]. Однако влияние адаптации к гипоксии на гиперпродукцию NO и его токсические эффекты при нейродегенеративных заболеваниях изучено мало. В настоящем обзоре будут рассмотрены современные данные о возможности применения адаптационной защиты при болезни Альцгеймера (БА) и роли предупреждения гиперпродукции NO в этой защите.

#### **Роль гиперпродукции NO в патогенезе болезни Альцгеймера**

Характерными гистологическими признаками БА являются образование нейрофибрилярных клубков и токсичных сенильных бляшек в гиппокампе и коре мозга. Нейрофибрилярные клубки формируются внутри нейронов и состоят из гиперфосфорилированных тау-белков. Сенильные бляшки образованы вне- и внутриклеточными отложениями пептида  $\beta$ -амилоида (A $\beta$ ), который продуцируется путем расщепления трансмембранного гликопротеида — белка-предшественника амилоида — и способен к самоагрегации. Агрегированный A $\beta$  запускает многие нейротоксичные механизмы, включая оксидативный стресс, нитрозативный стресс, эксайтотоксичность, истощение энергетических ресурсов, нарушение регуляции Ca<sup>2+</sup>, воспаление и апоптоз [72].

NO играет важную роль в прогрессировании БА [25]. В норме NO продуцируется в мозге нейрональной NOS в нейронах и эндотелиальной NOS в сосудах. При БА NO образуется в избытке, главным образом, в микроглии и астроцитах за счет активности iNOS. Ishii et al. [61] показали, что A $\beta$  прямо и дозозависимо стимулирует продукцию NO iNOS как *in vivo*, так и *in vitro*. Увеличение продукции NO iNOS вызывает нарушение пространственной памяти при экспериментальной БА, а специфический ингибитор iNOS аминуганидин предупреждает это нарушение [38]. Прямые нейротоксические эффекты избытка NO опосредованы дисфункцией митохондрий и истощением АТФ, которое приводит к падению мембранного потенциала митохондрий и высвобождению митохондриальных белков. Эти белки, включая цитохром *c* и Smac [59], в свою очередь, активируют каспазный каскад, ведущий к апоптотической гибели нейронов [22].

Очевидно, eNOS и nNOS также могут гиперпродуцировать NO при БА. Многочисленные данные показывают, что увеличение экспрессии всех изоформ NOS в различных клетках мозга вносит вклад в образование пероксинитрита, наблюдаемое при нейродегенерации [54]. Дейст-

вительно, оказалось, что повышение экспрессии nNOS, eNOS и iNOS в мозге при БА коррелирует с нитрованием тирозина белков [81].

NO угнетает дыхание митохондрий путем ингибирования цитохромоксидазы [34], комплекса I [26] и комплекса II [42]. Ингибирование дыхательной цепи митохондрий NO и его реактивными производными стимулирует выход из митохондрий супероксида [24]. Повреждение дыхательных комплексов митохондрий в нейронах и астроцитах, вызванное гиперпродукцией NO, играет особенно важную роль в развитии нейродегенеративного процесса [105]. Это нарушение может быть опосредовано как окислением, так и нитрованием дыхательных комплексов пероксинитритом [26], высвобождением глутамата и эксайтотоксичностью, вызванными действием NO [40], или продукцией активных форм кислорода вследствие ингибирования цитохромоксидазы NO или пероксинитритом [16].

В результате распада пероксинитрита, образовавшегося при соединении NO с супероксидом, и окисления NO образуется нитрит, который в дальнейшем окисляется до двуокиси азота в ходе реакции, катализируемой пероксидазами [106]. Двуокись азота является мощным нитрующим агентом, который с легкостью нитрует тирозин с образованием 3-НТ [39]. Это патологическое нитрование сопровождается развитием и прогрессированием нескольких нейродегенеративных заболеваний, включая БА. Интересно отметить, что большое количество 3-НТ обнаруживается в пораженных областях мозга больных БА [30]. Нитративное поражение развивается на ранних этапах БА и, по-видимому, играет важную роль в переходе от легких когнитивных расстройств к тяжелым нарушениям, типичным для БА [31].

Одной из причин гибели нейронов при гиперпродукции NO является эксайтотоксичность, которая представляет собой избыточное возбуждение нейронов под действием высоких концентраций внеклеточного глутамата, связывающегося с NMDA-рецепторами [40]. Ингибиторы дыхательной цепи, включая NO, способствуют апоптотической гибели нейронов, повышая их чувствительность к внеклеточному глутамату [97]. NO и пероксинитрит также могут вызывать высвобождение глутамата путем стимулирования экзоцитоза глутамат-содержащих везикул в нейронах и астроцитах [18, 78]. Эксайтотоксическое возбуждение может быть остановлено путем захвата глутамата ближайшими глиальными клетками, но A $\beta$  ингибирует этот захват, тем самым способствуя активации NMDA-рецепторов. Невозможность погасить возбуждение приводит к перегрузке нейронов Ca<sup>2+</sup> и нейродегенерации [25].

Важную роль в развитии когнитивных нарушений и нейродегенерации при БА играет так называемая нейрососудистая дисфункция, связанная с нарушением биодоступности NO, синтезированного eNOS и nNOS. Имеются весокие доказательства того, что БА является в значительной степени цереброваскулярным расстройством [36]. БА может развиваться в результате хронической гипоперфузии мозга, причем нарушение синтеза NO в сосудах эндотелиальной NOS, по-видимому, играет триггерную роль в этой цереброваскулярной патологии [35]. Хорошо известны васкулогенная потеря памяти или деменция и нейродегенерация, ассоциированная с церебральной ишемией и инсультом [108, 109].

Аβ прямо индуцирует дисфункцию эндотелия [48], а также увеличивает экспрессию белка iNOS в эндотелиальных клетках микрососудов []. Эндотелиальные клетки после инкубации с Аβ вызывают апоптоз нервных клеток в сокультуре, причем развитие этого апоптоза удается предупредить с помощью ингибитора NOS L-NAME [68]. Имеются данные о том, что микрососуды больных БА гиперпродуцируют NO и вызывают гибель нейронов *in vitro* [41, 50]. Помимо iNOS, другим источником избытка NO является аберрантная eNOS в эндотелиальных клетках. Такая eNOS, кроме NO, продуцирует большие количества супероксида и, следовательно, генерирует пероксинитрит [46]. Очевидно, избыток NO, синтезируемый в эндотелиальных клетках, вызывает тяжелые повреждения как самих мозговых сосудов, так и окружающих нейронов.

Развивающаяся в результате структурная патология микрососудов, которая часто наблюдается при БА [32, 66], приводит к дисфункции эндотелия и дисрегуляции NO, в первую очередь, в гиппокампе и энторинальной коре. Дисфункция и структурная патология сосудов вызывают сосудистое воспаление и активацию глиальных клеток и астроцитов. Эти факторы, включая отложения Аβ в сосудистом русле, ведут к дальнейшему снижению мозгового кровотока и дополнительной генерации провоспалительных стимулов, таких как активные формы кислорода и азота [25].

Все эти нарушения вызывают гипоперфузию мозга, обусловленную нарушением вазодилатации и удаления продуктов метаболизма и токсинов из внеклеточного пространства вследствие сниженной проницаемости капилляров [35]. Исследование, проведенное на пожилых пациентах с легкими нарушениями памяти, но пока не имеющих БА, показало, что БА развивается в течение ближайших 2 лет только у тех пациентов, у которых наблюдается значительная гипоперфузия амигдаларно-гиппокампальной области [63]. Описанные сосудистые нарушения приводят к угнетению метаболизма глюкозы и кислорода в мозге, коррелируют со степенью тяжести БА [36] и предшествуют развитию нейродегенерации, что свидетельствует о важной роли цереброваскулярных расстройств в патогенезе БА [29, 92].

#### **Влияние адаптации к гипоксии на гиперпродукцию NO при экспериментальной БА**

В ранних исследованиях мы показали, что адаптация к периодической гипобарической гипоксии ограничивает потерю памяти у крыс с экспериментальной БА [85, 91]. БА моделировали путем билатерального введения животным токсичного фрагмента Аβ (25-35) в *nucleus basalis magnocellularis* [57]. Адаптацию к гипобарической гипоксии создавали в барокамере при разрежении воздуха, соответствующем высоте 4000 м над уровнем моря. Общая продолжительность курса адаптации составляла 14 дней. «Высоту» и длительность воздействия постепенно увеличивали в течение первых 5 дней. Последний сеанс адаптации проводили за 24 часа до введения Аβ.

Вызванные Аβ повреждения и защитный эффект адаптации к гипоксии оценивали по степени сохранения памяти в тесте условно-рефлекторного пассивного избегания через 14 дней после введения Аβ. Крысу помещали на освещенную платформу и регистрировали латентный период, предшествующий переходу животного в затемнен-

ную камеру. Сразу после перехода в темную камеру крыса получала удар электрическим током. Через 24 часа проводили повторное тестирование и снова регистрировали латентный период перехода в темную камеру. При отсутствии нарушений памяти латентный период при повторном тестировании значительно удлинялся, или крыса вообще отказывалась заходить в темную камеру. У крыс, получивших инъекцию Аβ, увеличение латентного периода перехода в темную камеру при повторном тестировании было на 30% меньше, чем у контрольных животных. Этот факт свидетельствует об ухудшении памяти, которое является маркерным признаком БА. Адаптация к гипоксии достоверно увеличивала латентный период при втором тестировании, другими словами, ограничивала потерю памяти у крыс с экспериментальной БА [85, 91].

После того, как было установлено, что адаптация к периодической гипоксии способна ограничивать когнитивные нарушения при экспериментальной БА, мы изучили возможную роль предупреждения гиперпродукции NO в этом защитном эффекте. Для проверки предположения о том, что адаптация к гипоксии может предупреждать токсические эффекты избытка NO и его повреждающее воздействие на нейроны мозга, была использована та же модель экспериментальной БА и тот же режим адаптации к гипобарической гипоксии [49].

Введение Аβ приводило к значительному повышению содержания продуктов NO — нитритов и нитратов (NOx) в ткани мозга. Адаптация к гипоксии не вызвала достоверных изменений NOx в мозге интактных и ложнооперированных крыс, но полностью предупреждала гиперпродукцию NO в мозге крыс, получивших инъекции Аβ.

Развитие экспериментальной БА сопровождалось накоплением 3-НТ в коре и гиппокампе [5, 49]. Более выраженное повышение уровня 3-НТ в гиппокампе, чем в коре [49] согласуется с представлением о том, что гиппокамп является более уязвимой областью мозга при БА [99]. Адаптация к гипоксии достоверно не влияла на содержание 3-НТ в ткани гиппокампа, но увеличивала его в коре на 42% по сравнению с интактным контролем. При этом адаптация достоверно ограничивала повышение 3-НТ как в коре, так и в гиппокампе у крыс, получивших инъекции Аβ [49].

Введение Аβ приводило к выраженному увеличению экспрессии всех трех изоформ NOS — nNOS, iNOS и eNOS — как в коре, так и в гиппокампе [49]. Адаптация к гипоксии существенно не влияла на экспрессию NOS в коре, но увеличивала экспрессию всех трех изоформ в гиппокампе, хотя это увеличение было значительно меньше, чем при введении Аβ. Главным результатом этих экспериментов было то, что адаптация к гипоксии ограничивала увеличение экспрессии изоформ NOS, вызванное Аβ, в коре и гиппокампе. В наших экспериментах индукция eNOS под действием Аβ была более выраженной, чем индукция iNOS, хотя в литературе имеются данные о том, что главным источником NO при БА является iNOS, которая гиперпродуцирует NO в астроцитах, ассоциированных с амилоидными бляшками [58]. Однако более поздние данные указывают на важную роль eNOS [53], которая была выявлена не только в эндотелиальных, но также и в нейронах, и глиальных клетках [80].

Таким образом, по-видимому, все три изоформы NOS вносят вклад в развитие нейродегенеративного процесса.

eNOS и nNOS экспрессируются конститутивно, и для их активации обычно не требуется синтеза нового белка. Однако в патологических условиях эти изоформы также становятся индуцибельными [80,81].

Все три изоформы NOS, как и 3-НТ, при вскрытии обнаруживаются в височной коре больных БА [44]. Гиперэкспрессия nNOS в пирамидальных нейронах коры и iNOS и eNOS в глиальных клетках в высокой степени соответствует локализации 3-НТ. Следовательно, весьма вероятно, что гиперэкспрессия всех изоформ NOS в астроцитах и нейронах вносит вклад в генерацию активных форм азота, которая приводит к тяжелым повреждениям нейронов [81]. Наши эксперименты прямо доказывают, что с помощью адаптации к гипоксии можно предупредить избыточную экспрессию всех трех изоформ NOS и тем самым ограничить гиперпродукцию NO в мозге, вызванную введением Аβ [49].

#### **Нейро- и вазопротекторные эффекты адаптации к гипоксии при нейродегенерации**

Гиперпродукция NO играет важную роль в развитии нейродегенерации и гибели нейронов при различных заболеваниях и патологических состояниях. Во многих исследованиях была убедительно продемонстрирована способность адаптации к гипоксии предупреждать повреждения и гибель нейронов *in vivo* и *in vitro*. Так, адаптация к периодической гипобарической гипоксии оказывала защитное действие при экспериментальной и клинической эпилепсии [6, 10, 12, 93], которая сопровождается гиперпродукцией NO, синтезируемого iNOS [33].

Считается, что гиперпродукция NO прямо связана с повреждениями, вызванными алкоголизмом и синдромом отмены [73]. Отмена алкоголя индуцирует экспрессию iNOS, гибель нейронов в неокортексе, гиппокампе и мозжечке и приводит к поведенческим нарушениям [101]. Адаптация к периодической гипоксии у крыс в период отмены алкоголя ограничивает повреждения мозга и нарушения поведения при последующей отмене алкоголя [65], хотя связь этого защитного эффекта с ограничением гиперпродукции NO в этих исследованиях не изучалась. Адаптация к гипобарической гипоксии успешно использовалась в рамках комплексной терапии у больных алкоголизмом [93]. Также показано, что гипоксическое preconditionирование предупреждает ишемические [21, 79, 103] и окислительные повреждения мозга [65, 79].

Особое внимание исследователей привлекают защитные эффекты адаптации к периодической гипоксии при болезни Паркинсона. Активация микроглии и повышенная экспрессия и активность iNOS играют ключевую роль в развитии этого заболевания [70]. Адаптация к нормобарической гипоксии эффективно предупреждает поведенческие нарушения, сопровождающие экспериментальную болезнь Паркинсона [51]. В число механизмов этого защитного эффекта входят нормализация обмена дофамина в мозге и усиление антиоксидантной защиты [20]. У пациентов с паркинсонизмом гипоксические тренировки улучшают электромиограмму, уменьшают мышечный тремор и нормализуют двигательную активность [69].

Мы получили прямые доказательства нейропротекторного эффекта адаптации к гипоксии при экспериментальной БА, проведя в мозге гистопатологический анализ [7, 49]. Для визуализации дегенерирующих нейронов 10-мкм срезы височно-теменной коры окрашивались по

Нислю гематоксилином-эозином, ванадиевым фуксинном кислым и крезильным фиолетовым. Дегенерирующие нейроны у контрольных крыс не обнаруживались. После введения Аβ в коре присутствовали многочисленные сморщенные, гиперхромные дегенерирующие нейроны. Нейроны с этими патоморфологическими признаками практически отсутствовали у адаптированных к гипобарической гипоксии крыс, получивших Аβ. Таким образом, адаптация к гипоксии предупреждает нейродегенерацию в мозге, вызванную токсическим эффектом Аβ.

Наши исследования показали, что адаптация к гипоксии способна предупреждать как функциональные, так и структурные повреждения мозговых сосудов у крыс с экспериментальной БА. Дисфункция эндотелия мозговых сосудов существенно нарушает ауторегуляцию локального мозгового кровотока (ЛМК) у животных, получивших инъекцию Аβ, и у трансгенных животных с гиперэкспрессией Аβ, причем степень тяжести дисфункции эндотелия положительно коррелирует с концентрацией Аβ в мозге [98]. В то же время, снижение ЛМК в височно-теменной коре положительно коррелирует с тяжестью когнитивных расстройств у пациентов с БА [19].

Нарушение эндотелийзависимой вазодилатации ослабляет дилататорный ответ мозговых сосудов на снижение трансмурального давления, что делает мозг высоко уязвимым для колебаний артериального давления, даже в нормальных пределах, и увеличивает тяжесть повреждений, вызванных ишемией и окклюзией мозговых сосудов [111]. Важно отметить, что вызванная Аβ дисфункция эндотелия предшествует развитию нейродегенерации в мозге [95] и, следовательно, является одним из ключевых патофизиологических механизмов БА.

Мы изучали эндотелийзависимую дилатацию сосудов в теменной коре крыс, используя непрерывную регистрацию ЛМК с помощью лазерного доплеровского флоуметра [9]. Эндотелийзависимая дилатация оценивалась по реакции ЛМК на введение ацетилхолина в сонную артерию. Это исследование показало, что введение Аβ уменьшает эндотелийзависимую дилатацию на 75-80%. Адаптация к гипобарической гипоксии сама по себе не оказывала влияния на этот показатель, но полностью предупреждала дисфункцию эндотелия, вызванную Аβ.

Развитие БА сопровождается прогрессирующей дегенерацией ультраструктурных элементов стенки кортикальных капилляров [15]. Регионарный мозговой кровоток в гиппокампе и височной коре у больных БА также значительно ниже, чем у здоровых лиц того же возраста [67]. Исследование мозга больных БА при вскрытии показало наличие резкого и статистически достоверного снижения плотности сосудистой сети, особенно базальной области переднего мозга и в гиппокампе. Кроме того, в мозговых сосудах больных БА наблюдаются выраженные топографические изменения, такие как извилистость и образование петель [27, 45]. В других исследованиях также было продемонстрировано значительное (на 16-38%) снижение плотности капиллярной сети в различных участках мозга больных БА [17, 27, 28, 45]. Это снижение плотности сосудов коррелировало с повышением оценки по шкале клинической деменции [17]. Такие же микрососудистые изменения наблюдались и при экспериментальной БА у животных [17, 27, 77, 100].

Одним из адаптивных структурных изменений в ответ на длительное действие гипоксии является увеличение плотности капиллярной сети. За счет этого механизма уменьшается расстояние межкапиллярной диффузии [74]. За время гипоксического воздействия у крыс плотность капиллярной сети в мозге почти удваивается, а межкапиллярное расстояние уменьшается примерно с 50 до 40 мкм [75]. Narik et al. [55, 56] показали, что плотность капилляров начинает увеличиваться к концу первой недели гипоксического воздействия, и этот процесс завершается между 2-й и 3-й неделями гипоксии. Очевидно, это увеличение плотности сосудистой сети в мозге обусловлено гипоксическим стимулированием ангиогенеза [23].

Недавно мы проверили предположение о том, что одним из механизмов благоприятного эффекта адаптации к гипоксии при нейродегенерации является сохранение способности к компенсаторному ангиогенезу в мозге [88]. Мозговые сосуды окрашивались путем транскардиального введения туши. После окраски 10-мкм срезов мозга крезильным фиолетовым подсчитывалась плотность мозговых сосудов. У крыс с экспериментальной БА плотность сосудистой сети как в гиппокампе, так и в коре была достоверно снижена на 22-25%. Адаптация к гипобарической гипоксии увеличивала плотность сосудистой сети. У адаптированных крыс, получивших Аβ, плотность сосудистой сети достоверно не отличалась от таковой в соответствующих участках мозга контрольных животных.

#### **Возможные механизмы предупреждения гиперпродукции NO при адаптации к гипоксии**

Адаптация к гипоксии может ограничивать гиперпродукцию NO в мозге при БА с помощью нескольких механизмов:

- 1) ограничение гиперпродукции NO за счет дефицита кислорода, который является субстратом NOS;
- 2) умеренное повышение уровня NO, обеспечивающее ингибирование NOS за счет механизма отрицательной обратной связи;
- 3) модулирование кислородом ингибирующего механизма отрицательной обратной связи;
- 4) ограничение оксидативного стресса;
- 5) связывание избытка NO в депо.

Изучение связи между концентрацией O<sub>2</sub> и активностью изоформ NOS в мозге коровы, эндотелиальных клетках аорты и макрофагах показало, что значения кажущейся K<sub>m</sub> для nNOS, eNOS и iNOS, соответственно, составляют 23,2, 7,7 и 6,3 мкМ O<sub>2</sub> [104]. В другом исследовании расчетное значение K<sub>m</sub> для nNOS составило 400 мкМ O<sub>2</sub> [14]. Поскольку значения K<sub>m</sub> для изоформ NOS определялись в нормальном диапазоне тканевых концентраций O<sub>2</sub>, любое снижение тканевого O<sub>2</sub> должно привести к уменьшению продукции NO [76, 104]. Действительно, острая тяжелая гипоксия (0,1-0,2% O<sub>2</sub>) снижает продукцию NO всеми тремя изоформами NOS в культуре клеток на 60-80% [14, 76]. Менее тяжелая гипоксия (4,8% O<sub>2</sub>) [53] лишь умеренно угнетает продукцию NO. Этот эффект гипоксии может быть ограничен увеличением входа в клетки Ca<sup>2+</sup>, который активирует Ca<sup>2+</sup>/кальмодулин-зависимые изоформы NOS [52, 53].

Адаптация к гипоксии вызывает умеренное усиление экспрессии всех трех изоформ NOS и продукции NO в мозге [49]. Другим NOS-независимым источником дополнительного NO при адаптации к гипоксии могут быть ни-

тристы, которые представляют собой самый большой из всех известных химических пулов биодоступного NO в организме [37]. Повышение уровня NO может предупредить гиперпродукцию NO в мозге при АД за счет ингибирования NOS посредством механизма отрицательной обратной связи. NO может связываться с Fe<sup>2+</sup> NOS, образуя комплекс гем-NO (NOSFe<sup>2+</sup>NO), который препятствует связыванию гемовой группы с O<sub>2</sub> и, таким образом, повышает кажущуюся K<sub>m</sub> для O<sub>2</sub> [14, 76]. В результате такого тонического ингибирования в обычных условиях NOS использует лишь небольшую часть своих каталитических возможностей [14, 76].

Ингибирование NOS оксидом азота модулируется концентрацией O<sub>2</sub>, поскольку O<sub>2</sub> и NO конкурируют за связывание с гемовым железом. Кроме того, от концентрации O<sub>2</sub> зависит скорость распада комплекса гемового железа с NO: при снижении концентрации O<sub>2</sub> он вытесняет меньшее количество NO, и продукция NO снижается [14]. При дальнейшей диссоциации комплекса гем-NO и связывании с O<sub>2</sub> происходит восстановление активности фермента (NOSFe<sup>3+</sup>) [14, 60]. Чувствительность комплекса железо-NO к O<sub>2</sub> определяет общую реакцию NOS на O<sub>2</sub>. Именно за счет этого механизма NOS синтезирует NO пропорционального концентрации O<sub>2</sub> в физиологических пределах (0-250 мкМ) [111].

Другим важным нейропротекторным механизмом адаптации к гипоксии является ограничение оксидативного стресса в ткани мозга в результате активации антиоксидантной защиты. Действительно, показано, что 7-часовое гипоксическое воздействие при 10% O<sub>2</sub> не влияет на вызванную Fe<sup>2+</sup> хемилюминесценцию и скорость накопления продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) в плазме крови и в мозге. Адаптация к гипоксии в течение 2 недель вызывает некоторую активацию свободнорадикальных процессов и при этом значительно активирует эндогенную антиоксидантную систему [2]. В наших экспериментах [11] формирование защитного эффекта адаптации к гипоксии сопровождалось ограничением оксидативного стресса в гиппокампе крыс с экспериментальной БА, что проявлялось в соответствующем снижении уровня ТБК-реактивных продуктов в ткани мозга. В других работах было показано, что воздействия, подавляющие оксидативный стресс при экспериментальной БА, предупреждают экспрессию iNOS в мозге *in vivo* [62] и астроцитах *in vitro* [113].

Наконец, адаптация к гипоксии способствует связыванию NO в комплексы с образованием депо NO [86]. Связывание NO с белками образует буферную систему, удаляющую избыток NO и способную постепенно высвобождать NO, тем самым работая как неферментативный источник свободного NO [112]. Депо NO в норме часто не выявляется; оно формируется в ответ на повышение концентрации NO, вызванное активацией NOS или введением экзогенных доноров NO [86]. В то же время, выделяя свободный NO, депо NO может компенсировать патологическое снижение синтеза NO в эндотелиальных клетках и ограничивать гиперпродукцию NO по механизму отрицательной обратной связи. В процессе адаптации образование депо NO прогрессивно нарастает [86].

Важные данные о протекторной роли депо NO при гиперпродукции NO были получены на крысах с экспериментальной БА, вызванной введением Аβ [9]. Депо NO оценивали с помощью метода, основанного на способно-

сти N-ацетилцистеина (N-АЦ) взаимодействовать с внутриклеточным депо NO и высвобождать вазоактивные продукты, которые увеличивают ЛМК [4]. Величину депо NO оценивали в присутствии ингибитора NOS, чтобы исключить вклад NO, синтезированного *de novo*, в вазодилаторный ответ. Увеличение ЛМК в ответ на введение N-АЦ в сонную артерию отражало расширение мозговых сосудов и соответствовало величине депо NO. Поскольку величина депо NO коррелирует с концентрацией продуктов NO в плазме [90], увеличение депо NO может рассматриваться как косвенный показатель гиперпродукции NO. Депо NO в мозговых сосудах контрольных крыс отсутствовало, однако как у адаптированных крыс, так и у крыс, получивших Аβ, введение N-АЦ выявляло депо NO. У крыс, получивших Аβ после адаптации к гипоксии, депо NO было больше, чем у неадаптированных крыс с экспериментальной БА [9]. Ранее было показано, что адаптация к гипоксии вызывает небольшое увеличение продукции NO и образование депо NO в аорте крыс [86, 90]. Показано также, что при этом адаптация к гипоксии существенно увеличивает эффективность связывания NO в депо [4]. Этот механизм может обеспечивать защиту сосудов от последующей гиперпродукции NO у крыс с экспериментальной БА [9, 86].

#### Заключение

Адаптация к гипоксии блокирует ряд звеньев патогенеза БА. В основе защитных механизмов адаптации к гипоксии лежит умеренное стимулирование синтеза NO и прямое или опосредованное механизмом отрицательной обратной связи ограничение гиперпродукции NO самим NO, синтезированным NOS или поступающим из альтернативных источников. NO, синтезированный в процессе адаптации, может ограничивать последующую гиперпродукцию NO посредством отрицательной обратной связи. Адаптация к гипоксии уменьшает оксидативный стресс, вызванный Аβ, и тем самым предупреждает индукцию iNOS свободными радикалами. Кроме того, адаптация к гипоксии блокирует взаимодействие избытка NO с супероксидом и образование пероксинитрита за счет связывания NO в депо. Ограничивая гиперпродукцию NO и токсическое действие его избытка, адаптация к гипоксии оказывает выраженные вазо- и нейропротекторные эффекты, благодаря которым она практически полностью предупреждает нарушения памяти и гибель нейронов мозга при экспериментальной БА. Таким образом, методы адаптационной медицины могут применяться в качестве стратегии активации эндогенных протекторных механизмов, способных предупреждать развитие и прогрессирование БА.

#### Список литературы

1. Белкина Л.М., Смирнова Е.А., Шимкович М.В., Терехина О.Л., Горячева А.В., Чепурнова Д.А., Дауни Г.Ф., Маллет Р.Т., Манухина Е.Б. Кардиопротекторный эффект адаптации к периодической нормобарической гипоксии у крыс // Патол. физиол. экспер. терапия. — 2012. — №4. — С. 44-48.
2. Белых А.Г., Гукасов В.М., Чукаев С.А. Состояние системы свободнорадикального окисления при действии нормобарической гипоксии // Физиол. Журнал. — 1992. — Т. 38, №5. — С. 73-76.
3. Власова М.А., Ванин А.Ф., Мюллер Б., Смирин Б.В., Малышев И.Ю., Манухина Е.Б. Выявление и характеристика раз-

ных пулов депо оксида азота в стенке сосуда // Бюлл. экспер. биол. и мед. — 2003. — Т. 136, №9. — С. 260-264.

4. Власова М.А., Смирин Б.В., Покидьшев Д.А., Машина С.Ю., Ванин А.Ф., Малышев И.Ю., Манухина Е.Б. Механизм адаптации сосудистой системы к хроническому изменению уровня оксида азота (NO) в организме // Бюлл. экспер. биол. и мед. — 2006. — Т. 142, №12. — С. 626-630.

5. Горячева А.В., Белкина Л.М., Терехина О.Л., Дауни Г.Ф., Маллет Р.Т., Смирин Б.В., Смирнова Е.А., Машина С.Ю., Манухина Е.Б. Роль предупреждения гиперпродукции оксида азота в кардиопротекторном эффекте адаптации к периодической гипоксии // Патол. физиол. экспер. терапия. — 2012. — №1. — С. 23-28.

6. Кошелев В.Б., Фадюкова О.Е., Реутов В.П., Крушинский А.Л., Кузенков В.С., Буравков С.В., Антистрессорное и ангиопротекторное влияние оксида азота на крыс линии Крушинского-Молодкиной, генетически предрасположенных к аудиогенной эпилепсии // Росс. физиол. журнал им. И.М. Сеченова. — 2005. — Т. 91. — С. 89-96.

7. Манухина Е.Б., Горячева А.В., Барсков И.В., Викторов И.В., Гусева А.А., Пшенникова М.Г., Хоменко И.П., Машина С.Ю., Покидьшев Д.А., Малышев И.Ю. Предупреждение нейродегенеративного повреждения мозга крыс при экспериментальной болезни Альцгеймера с помощью адаптации к гипоксии // Росс. физиол. журнал им. И.М. Сеченова. — 2009. — Т. 95. — С. 706-715.

8. Манухина Е.Б., Пшенникова М.Г., Горячева А.В., Хоменко И.П., Машина С.Ю., Покидьшев Д.А., Малышев И.Ю. Роль оксида азота в предупреждении когнитивных нарушений при нейродегенеративном повреждении мозга у крыс // Бюлл. экспер. биол. и мед. — 2008. — Т. 146, №10. — С. 371-375.

9. Машина С.Ю., Александрин В.В., Горячева А.В., Власова М.А., Ванин А.Ф., Малышев И.Ю., Манухина Е.Б. Адаптация к гипоксии предупреждает нарушения мозгового кровообращения при нейродегенеративном повреждении: роль оксида азота // Бюлл. экспер. биол. и мед. — 2006. — Т. 142, №8. — С. 132-135.

10. Меерсон Ф.З., Пинелис В.Г., Кошелев В.Б., Голубева Л.Ю., Рясина Т.В., Арсеньев Е.Н., Крушинский А.Л., Сторожевых Т.П. Адаптация к периодической гипоксии ограничивает субдуральные кровоизлияния при аудиогенной эпилептиформных судорогах у крыс // Бюлл. экспер. биол. и мед. — 1993. — Т. 116, №12. — С. 572-574.

11. Пшенникова М.Г., Попкова Е.В., Покидьшев Д.А., Хоменко И.П., Зеленина О.М., Крулов С.В., Манухина Е.Б., Шимкович М.В., Горячева А.В., Малышев И.Ю. Влияние адаптации к гипоксии на устойчивость к нейродегенеративному повреждению мозга у крыс разных генетических линий // Вестник РАМН. — 2007. — №2. — С. 50-55.

12. Старых Е.В., Федин А.Л. Компьютерная ЭЭГ при комплексном лечении больных эпилепсией с применением метода прерывистой нормобарической гипокситерапии // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. — 2002. — Т. 102. — С. 27-29.

13. Abu-Soud H.M., Rousseau D.L., Stuehr D.J. Nitric oxide binding to the heme of neuronal nitric-oxide synthase links its activity to changes in oxygen tension // J. Biol. Chem. — 1996. — Vol. 271. — P. 32515-32518.

14. Abu-Soud H.M., Wang J., Rousseau D.L., Fukuto J.M., Ignarro L.J., Stuehr D.J. Neuronal nitric oxide synthase self-inactivates by forming a ferrous-nitrosyl complex during aerobic catalysis // J. Biol. Chem. — 1995. — Vol. 270. — P. 22997-23006.

15. Aliev G., Gasimov E., Obrenovich M.E., Fischbach K., Shenk J.C., Smith M.A., Perry G. Atherosclerotic lesions and mitochondrial DNA deletions in brain microvessels: implication in the pathogenesis of Alzheimer's disease // Vasc. Health Risk Manag. — 2008. — Vol. 4. — P. 721-730.

16. Aquilano K., Baldelli S., Cardaci S., Rotilio G., Ciriolo M.R. Nitric oxide is the primary mediator of cytotoxicity induced by GSH depletion in neuronal cells // J. Cell Sci. — 2011. — Vol. 124(Pt 7). — P. 1043-1054.

17. Bailey T.L., Rivara C.B., Rocher A.B., Hof P.R. The nature and effects of cortical microvascular pathology in aging and Alzheimer's disease // Neurol. Res. — 2004. — Vol. 26. — P. 573-578.

18. Bal-Price A., Moneer Z, Brown GC. Nitric oxide induces rapid, calcium-dependent release of vesicular glutamate and ATP from cultured rat astrocytes // Glia. — 2002. — Vol. 40. — P. 312-323.

19. Bartenstein P., Minoshima S., Hirsch C., Buch K. Quantitative assessment of cerebral blood flow in patients with Alzheimer's disease by SPECT // *J. Nucl. Med.* — 1997. — Vol. 38. — P. 1095-1101.
20. Belikova M.V., Kolesnikova E.E., Serebrovskaya T.V. Intermittent hypoxia and experimental Parkinson's disease. In: *Intermittent Hypoxia and Human Disease*. Xi L, Serebrovskaya TV, eds. — London.: Springer-Verlag., 2012. — P. 147-153.
21. Bernaudin M., Nedelec A.S., Divoux D., MacKenzie E.T., Petit E., Schumann-Bard P. Normobaric hypoxia induces tolerance to focal permanent cerebral ischemia in association with an increased expression of hypoxia-inducible factor-1 and its target genes, erythropoietin and VEGF, in the adult mouse brain // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* — 2002. — Vol. 22. — P. 393-403.
22. Bertoni-Freddari C., Fattoretti P., Casoli T., Di Stefano G., Baliani M., Giorgetti B., Perretta G. Neuronal apoptosis in Alzheimer's disease: the role of age-related mitochondrial metabolic competence // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* — 2009. — Vol. 1171. — P. 18-24.
23. Boero J.A., Ascher J., Arregui A., Rovainen C., Woolsey T.A. Increased brain capillaries in chronic hypoxia // *J. Appl. Physiol.* — 1999. — Vol. 86. — P. 1211-1219.
24. Borutaite V., Brown G.C. S-nitrosothiol inhibition of mitochondrial complex I causes a reversible increase in mitochondrial hydrogen peroxide production // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2006. — Vol. 1757. — P. 562-566.
25. Brown G.C. Nitric oxide and neuronal death // *Nitric Oxide.* — 2010. — Vol. 23. — P. 153-165.
26. Brown G.C., Borutaite V. Inhibition of mitochondrial respiratory complex I by nitric oxide, peroxynitrite and S-nitrosothiols // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2004. — Vol. 1658. — P. 44-49.
27. Brown W.R., Thore C.R. Review: Cerebral microvascular pathology in ageing and neurodegeneration // *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* — 2011. — Vol. 37. — P. 56-74.
28. Buee L., Hof P.R., Bouras C., Delacourte A., Perl D.P., Morrison J.H., Fillit H.M. Pathological alterations of the cerebral microvasculature in Alzheimer's disease and related dementing disorders // *Acta Neuropathol.* — 1994. — Vol. 87. — P. 469-480.
29. Bulbarelli A., Lonati E., Brambilla A., Orlando A., Cazzaniga E., Piazza F., Ferrarese C., Masserini M., Sancini G. Ab42 production in brain capillary endothelial cells after oxygen and glucose deprivation // *Mol. Cell Neurosci.* — 2012. — Vol. 49. — P. 415-422.
30. Butterfield D.A., Reed T., Sultana R. Roles of 3-nitrotyrosine and 4-hydroxynonenal-modified brain proteins in the progression and pathogenesis of Alzheimer's disease // *Free Radic. Res.* — 2011. — Vol. 45. — P. 59-72.
31. Butterfield D.A., Reed T.T., Perluigi M., De Marco C., Coccia R., Keller J.N., Markesbery W.R., Sultana R. Elevated levels of 3-nitrotyrosine in brain from subjects with amnesic mild cognitive impairment: implications for the role of nitration in the progression of Alzheimer's disease // *Brain Res.* — 2007. — Vol. 1148. — P. 243-248.
32. Christov A., Ottman J., Hamdheydari L., Grammas P. Structural changes in Alzheimer's disease brain microvessels // *Curr. Alzheimer Res.* — 2008. — Vol. 5. — P. 392-395.
33. Chuang Y.C., Chen S.D., Lin T.K., Chang W.N., Lu C.H., Liou C.W., Chan S.H., Chang A.Y. Transcriptional upregulation of nitric oxide synthase II by nuclear factor-kappaB promotes apoptotic neuronal cell death in the hippocampus following experimental status epilepticus // *J. Neurosci. Res.* — 2010. — Vol. 88. — P. 1898-1907.
34. Cooper C.E., Giulivi C. Nitric oxide regulation of mitochondrial oxygen consumption II: molecular mechanism and tissue physiology // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* — 2007. — Vol. 292. — P. C1993-C2003.
35. de la Monte S.M., Sohn Y.K., Etienne D., Kraft J., Wands J.R. Role of aberrant nitric oxide synthase-3 expression in cerebrovascular degeneration and vascular-mediated injury in Alzheimer's disease // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* — 2000. — Vol. 903. — P. 61-71.
36. de la Torre J.C. Vascular basis of Alzheimer's pathogenesis // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* — 2002. — Vol. 977. — P. 196-215.
37. Dezfulian C., Raat N., Shiva S., Gladwin M.T. Role of the anion nitrite in ischemia-reperfusion cytoprotection and therapeutics // *Cardiovasc. Res.* — 2007. — Vol. 75. — P. 327-338.
38. Diaz A., Mendieta L., Zenteno E., Guevara J., Limon I.D. The role of NOS in the impairment of spatial memory and damaged neurons in rats injected with amyloid beta 25-35 into the temporal cortex // *Pharmacol. Biochem. Behav.* — 2011. — Vol. 98. — P. 67-75.
39. d'Ischia M., Napolitano F., Manini P., Panzella L. Secondary targets of nitrite-derived reactive nitrogen species: nitrosation/nitration pathways, antioxidant defense mechanisms and toxicological implications // *Chem. Res. Toxicol.* — 2011. — Vol. 24. — P. 2071-2092.
40. Dong X.X., Wang Y., Qin Z.H. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases // *Acta Pharmacol. Sin.* — 2009. — Vol. 30. — P. 379-387.
41. Dorheim M.A., Tracey W.R., Pollock J.S., Grammas P. Nitric oxide is elevated in Alzheimer's brain microvessels // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1994. — Vol. 205. — P. 659-665.
42. Erusalimsky J.D., Moncada S. Nitric oxide and mitochondrial signaling: from physiology to pathophysiology // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 2007. — Vol. 27. — P. 2524-2531.
43. Erwin P.A., Lin A.J., Golan D.E., Michel T. Receptor-regulated dynamic S-nitrosylation of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial cells // *J. Biol. Chem.* — 2005. — Vol. 280. — P. 19888-19894.
44. Fernandez-Vizarrá P., Fernández A.P., Castro-Blanco S., Encinas J.M., Serrano J., Bentura M.L., Mucoz P., Martínez-Murillo R., Rodrigo J. Expression of nitric oxide system in clinically evaluated cases of Alzheimer's disease // *Neurobiol. Dis.* — 2004. — Vol. 15. — P. 287-305.
45. Fischer V.W., Siddiqi A., Yusufaly Y. Altered angioarchitecture in selected areas of brains with Alzheimer's disease // *Acta Neuropathol.* — 1990. — Vol. 79. — P. 672-679.
46. Forstermann U., Li H. Therapeutic effect of enhancing endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression and preventing eNOS uncoupling // *Br. J. Pharmacol.* — 2011. — Vol. 164. — P. 213-223.
47. Forstermann U., Sessa W.C. Nitric oxide synthases: regulation and function // *Eur. Heart J.* — 2012. — Vol. 33. — P. 829-837.
48. Gentile M.T., Vecchione C., Maffei A., Aretini A., Marino G., Poulet R., Capobianco L., Selvetella G., Lembo G. Mechanisms of soluble beta-amyloid impairment of endothelial function // *J. Biol. Chem.* — 2004. — Vol. 279. — P. 48135-48142.
49. Goryacheva A.V., Kruglov S.V., Pshennikova M.G., Smirin B.V., Malyshev I.Yu., Barskov I.V., Viktorov I.V., Downey H.F., Manukhina E.B. Adaptation to intermittent hypoxia restricts nitric oxide overproduction and prevents beta-amyloid toxicity in rat brain // *Nitric Oxide* — 2011. — Vol. 23. — P. 289-299.
50. Grammas P., Reimann-Philipp U., Weigel P.H. Cerebrovascular-mediated neuronal cell death // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* — 2000. — Vol. 903. — P. 55-60.
51. Gulyaeva N.V., Stepanichev M.V., Onifriev M.V., Sergeev I.V., Mitrokhina O.S., Moiseeva Yu.V., Tkatchouk E.N. Interval hypoxia training prevents oxidative stress in striatum and locomotor disturbances in a rat model of parkinsonism // Fisher A., Hanlin I., Yoshida M., eds. *Progress in Alzheimer's and Parkinson's diseases.* — New York: Plenum Press, 1998. — P. 717-723.
52. Hampl V., Herget J. Role of nitric oxide in the pathogenesis of chronic pulmonary hypertension // *Physiol. Rev.* — 2000. — Vol. 80. — P. 1337-1372.
53. Hampl V., Cornfield D.N., Cowan N.J., Archer S.L. Hypoxia potentiates nitric oxide synthesis and transiently increases cytosolic calcium levels in pulmonary artery endothelial cells // *Eur. Respir. J.* — 1995. — Vol. 8. — P. 515-522.
54. Han F., Fukunaga K. Beta-amyloid accumulation in neurovascular units following brain embolism // *J. Pharmacol. Sci.* — 2009. — Vol. 111. — P. 101-109.
55. Harik N., Harik S.I., Kuo N.-T., Sakai K., Przybylski R.J., LaManna J.C. Time course and reversibility of the hypoxia-induced alterations in cerebral vascularity and cerebral capillary glucose transporter density // *Brain Res.* — 1996. — Vol. 737. — P. 335-338.
56. Harik S.I., Hritz M.A., LaManna J.C. Hypoxia-induced brain angiogenesis in the adult rat // *J. Physiol. (Lond.)* — 1995. — Vol. 485(Pt2). — P. 525-530.
57. Harkany T., O'Mahony S., Kelly J., Soos K., Toro I., Penke B., Luiten P.G.M., Nyakas C., Gulya K., Leonard B.E.  $\beta$ -Amyloid (Phe(SO<sub>3</sub>H))<sub>2425-35</sub> in rat nucleus basalis induces behavioral dysfunctions impairs learning and memory and disrupts cortical cholinergic innervation // *Behav. Brain Res.* — 1998. — Vol. 90. — P. 133-145.
58. Heneka M.T., Feinstein D.L. Expression and function of inducible nitric oxide synthase in neurons // *J. Neuroimmunol.* 2001. — Vol. 114. — P. 8-18.
59. Hsu M.J., Sheu J.R., Lin C.H., Shen M.Y., Hsu C.Y. Mitochondrial mechanisms in amyloid beta peptide-induced cerebrovascular degeneration // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2010. — Vol. 1800. — P. 290-296.

60. Hurshman A.R., Marletta M.A. Nitric oxide complexes of inducible nitric oxide synthase: spectral characterization and effect on catalytic activity // *Biochemistry*. — 1995. — Vol. 34. — P. 5627-5634
61. Ishii K., Muelhauser F., Liebl U., Picard M., Kuhl S., Penke B., Bayer T., Wiessler M., Hennerici M., Beyreuther K., Hartmann T., Fassbender K. Subacute NO generation induced by Alzheimer's  $\beta$ -amyloid in the living brain: reversal by inhibition of the inducible NO synthase // *FASEB J.* — 2000. — Vol. 14. — P. 1485-1489.
62. Javed H., Khan M.M., Ahmad A., Vaibhav K., Ahmad M.E., Khan A., Ashafaq M., Islam F., Siddiqui M.S., Safhi M.M., Islam F. Rutin prevents cognitive impairments by ameliorating oxidative stress and neuroinflammation in rat model of sporadic dementia of Alzheimer type // *Neuroscience*. — 2012. — Vol. 210. — P. 340-352.
63. Johnson K.A., Jones K., Holman B.L., Becker J.A., Spiers P.A., Satlin A., Albert M.S. Preclinical prediction of Alzheimer's disease using SPECT // *Neurology*. — 1998. — Vol. 50. — P. 1563-1515.
64. Jung K.H., Chu K., Ko S.Y., Lee S.T., Sinn D.I., Park D.K., Kim J.M., Song E.C., Kim M., Roh J.K. Early intravenous infusion of sodium nitrite protects brain against in vivo ischemia-reperfusion injury // *Stroke*. — 2006. — Vol. 37. — P. 2744-2750.
65. Jung M.E., Simpkins J.W., Wilson A.M., Downey H.F., Mallet R.T. Intermittent hypoxia conditioning prevents behavioral deficit and brain oxidative stress in ethanol-withdrawn rats // *J. Appl. Physiol.* — 2008. — Vol. 105. — P. 510-517.
66. Kalaria R.N., Hedera P. Differential degeneration of the cerebral microvasculature in Alzheimer's disease // *NeuroRep*. 1995. — Vol. 6. — P. 477-480.
67. Kataoka K., Hashimoto H., Kawabe J., Higashiyama S., Akiyama H., Shimada A., Kai T., Inoue K., Shiomi S., Kiriike N. Frontal hypoperfusion in depressed patients with dementia of Alzheimer type demonstrated on 3DSRT // *Psychiatry Clin. Neurosci.* — 2010. — Vol. 64. — P. 293-298
68. Kimura C., Oike M., Watanabe M., Ito Y. Proapoptotic nitric oxide production in amyloid  $\beta$  protein-treated cerebral microvascular endothelial cells // *Microcirculation*. — 2007. — Vol. 14. — P. 89-97.
69. Kolesnikova E.E., Serebrovskaya T.V. Parkinson's disease and intermittent hypoxia training. In: *Intermittent Hypoxia: From Molecular Mechanisms to Clinical Applications*. Xi L., Serebrovskaya T.V., eds. — New York: Nova Science Publ., 2009. — P. 549-560.
70. Koppula S., Kumar H., Kim I.S., Choi D.K. Reactive oxygen species and inhibitors of inflammatory enzymes, NADPH oxidase, and iNOS in experimental models of Parkinson's disease // *Mediators Inflamm.* — 2012. — Vol. 2012. — ID.823902. Epub 2012.
71. Kroncke K.D., Fehsel K., Kolb-Bachofen V. Inducible nitric oxide synthase in human diseases // *Clin. Exp. Immunol.* — 1998. — Vol. 113. — P. 147-156.
72. LaFerla F.M. Pathways linking Abeta and tau pathologies // *Biochem. Soc. Trans.* — 2010. — Vol. 38. — P. 993-995.
73. Lallemand F., De Witte P. L-NNA decreases cortical vascularization, alcohol preference and withdrawal in alcoholic rats // *Pharmacol. Biochem. Behav.* — 1997. — Vol. 58. — P. 753-761.
74. LaManna J.C., Chavez J.C., Pichiule P. Structural and functional adaptation to hypoxia in the rat brain // *J. Exp. Biol.* — 2004. — Vol. 207(Pt 18). — P. 3163-3169.
75. Lauro K.L., LaManna J.C. Adequacy of cerebral vascular remodeling following three weeks of hypobaric hypoxia. Examined by an integrated composite analytical model // *Adv. Exp. Med. Biol.* — 1997. — Vol. 411. — P. 369-376.
76. Le Cras T.D., McMurty I.F. Nitric oxide production in the hypoxic lung // *Am. J. Physiol.* — 2001. — Vol. 280. — P. L575-L582.
77. Lee G.D., Aruna J.H., Barrett P.M., Lei D.L., Ingram D.K., Mouton P.R. Stereological analysis of microvascular parameters in a double transgenic model of Alzheimer's disease // *Brain Res. Bull.* — 2005. — Vol. 65. — P. 317-322.
78. Leist M., Fava E., Montecucco C., Nicoletta P. Peroxynitrite and nitric oxide donors induce neuronal apoptosis by eliciting autocrine excitotoxicity // *Eur. J. Neurosci.* — 1997. — Vol. 9. — P. 1488-1498.
79. Lin A.M.Y. Hypoxic preconditioning protects against oxidative injury in the central nervous system // Xi L., Serebrovskaya T.V., eds. // *Intermittent Hypoxia: From Molecular Mechanisms to Clinical Applications*. — New York: Nova Science Publ. Inc., 2009. — P. 313-327.
80. Luth H.J., Holzer M., Gartner U., Staufenbiel M., Arendt T. Expression of endothelial and inducible NOS-isoforms is increased in Alzheimer's disease, in APP23 transgenic mice and after experimental brain lesion in rat: evidence for an induction by amyloid pathology // *Brain Res.* — 2001. — Vol. 913. — P. 57-67.
81. Luth H.J., Munch G., Arendt T. Aberrant expression of NOS isoforms in Alzheimer's disease is structurally related to nitrotyrosine formation // *Brain Res.* — 2002. — Vol. 935. — P. 135-143.
82. Maczurek A., Hager K., Kenkies M., Sharman M., Martins R., Engel J., Carlson D.A., Munch G. Lipoic acid as an anti-inflammatory and neuroprotective treatment for Alzheimer's disease // *Adv. Drug Deliv. Rev.* — 2008. — Vol. 60. — P. 1463-1470.
83. Malinski T. Nitric oxide and nitroxidative stress in Alzheimer's disease. // *J. Alzheimers Dis.* — 2007. — Vol. 11. — P. 207-218.
84. Malyshev I.Y., Zenina T.A., Golubeva L.Y., Saltykova V.A., Manukhina E.B., Mikoyan V.D., Kubrina L.N., Vanin A.F. NO-dependent mechanisms of adaptation to hypoxia // *Nitric Oxide*. — 1999. — Vol. 3. — P. 105-113.
85. Malyshev I.Yu., Wiegant F.A.C., Mashina S.Yu., Torshin V.I., Goryacheva A.V., Khomenko I.P., Kruglov S.V., Pokidyshev D.A., Popkova E.V., Pshennikova M.G., Vlasova M.A., Zelenina O.M., Manukhina E.B. Possible use of adaptation to hypoxia in Alzheimer's disease: a hypothesis // *Med. Sci. Monit.* — 2005. — Vol. 11. — P. HY31-HY38.
86. Manukhina E.B., Downey H.F., Mallet R.T., Goryacheva A.V., Malyshev I.Y. Vanin A.F. Role of nitric oxide (NO) stores in adaptive defense against NO overproduction. *Adaptation Biology and Medicine*, Vol. 6: Cell Adaptations and Challenges, Wang P., Kuo C.-H., Takeda N., Singal P. — New Delhi: Narosa Publishing House Ltd., 2011. — P. 293-315.
87. Manukhina E.B., Downey H.F., Mallet R.T. Role of nitric oxide in cardiovascular adaptation to intermittent hypoxia // *Exp. Biol. Med.* — 2006. — Vol. 231. — P. 343-365.
88. Manukhina E.B., Goryacheva A.V., Pshennikova M.G., Malyshev I.Yu., Mallet R.T., Downey H.F. Protective effects of adaptation to hypoxia in experimental Alzheimer's disease. In: Xi L, Serebrovskaya T.V., eds. *Intermittent Hypoxia and Human Disease*. — London: Springer-Verlag, 2012. — P. 155-171.
89. Manukhina E.B., Lapshin A.V., Meerson F.Z. Adaptation to intermittent hypoxia prevents disorders of endothelium-dependent relaxation and fall of blood pressure in experimental myocardial infarction // *Hypoxia Med. J.* — 1994. — Vol. 1. — P. 15-18.
90. Manukhina E.B., Malyshev I.Yu., Smirin B.V., Mashina S.Yu., Saltykova V.A., Vanin A.F. Production and storage of nitric oxide in adaptation to hypoxia // *Nitric Oxide*. — 1999. — Vol. 3. — P. 393-401.
91. Manukhina E.B., Wiegant F.A.C., Goryacheva A.V., Khomenko I.P., Kruglov S.V., Mashina S.Yu., Pokidyshev D.A., Popkova E.V., Pshennikova M.G., Vlasova M.A., Zelenina O.M., Malyshev I.Yu. Prospects for using methods of adaptive medicine in Alzheimer's disease. In: Singal PK, Takeda N, eds. *Adaptation Biology and Medicine*. — New Delhi: Narosa Publishers, 2005. — P.204-226.
92. Massoud F., Gauthier S. Update on the Pharmacological Treatment of Alzheimer's Disease // *Curr. Neuropharmacol.* — 2010. — Vol. 8. — P. 69-80.
93. Meerson F.Z. *Essentials of Adaptive Medicine: Protective Effects of Adaptation*. Moscow: Hypoxia Medical LTD. — 1994.
94. Mitchell D.A., Erwin P.A., Michel T., Marletta M.A. S-nitrosation and regulation of inducible nitric oxide synthase // *Biochemistry*. — 2005. — Vol. 44. — P. 4636-4647.
95. Miyazaki K., Ohta Y., Nagai M., Morimoto N., Kurata T., Takehisa Y., Ikeda Y., Matsuura T., Abe K. Disruption of neurovascular unit prior to motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis // *J. Neurosci. Res.* — 2011. — Vol. 89. — P. 718-728.
96. Nakamura T., Lipton S.A. Redox regulation of mitochondrial fission, protein misfolding, synaptic damage, and neuronal cell death: potential implications for Alzheimer's and Parkinson's diseases. // *Apoptosis*. — 2010. — Vol. 15. — P. 1354-1363.
97. Nicholls D.G., Budd S.L. Neuronal excitotoxicity: the role of mitochondria // *Biofactors*. — 1997. — Vol. 8. — P. 287-299.
98. Niwa K., Kazama K., Younkin L., Younkin S.G., Carlson G.A., Iadecola C. Cerebrovascular autoregulation is profoundly impaired in mice overexpressing amyloid precursor protein // *Am. J. Physiol.* — 2002. — Vol. 283. — P. H315-H323.
99. Padurariu M., Ciobica A., Mavroudis I., Fotiou D., Baloyannis S. Hippocampal neuronal loss in the CA1 and CA3 areas of Alzheimer's disease patients // *Psychiatr. Danub.* — 2012. — Vol. 24. — P. 152-158.
100. Paris D., Patel N., DelleDonne A., Quadros A., Smeed R., Mullan M. Impaired angiogenesis in a transgenic mouse model of cerebral amyloidosis // *Neurosci. Lett.* 2004. — Vol. 366. — P. 80-85.

101. Pascual M., Ianco A.M., Cauli O., Minarro J., Guerri C. Intermittent ethanol exposure induces inflammatory brain damage and causes long-term behavioural alterations in adolescent rats // *Eur. J. Neurosci.* — 2007. — Vol. 25. — P. 541-550.
102. Pautz A., Art J., Hahn S., Nowag S., Voss C., Kleinert H. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase // *Nitric Oxide.* — 2010. — Vol. 23. — P. 75-93.
103. Prass K., Scharff A., Ruscher K., Lowl D., Muselmann C., Victorov I., Kapinya K., Dirnagl U., Meisel A. Hypoxia-induced stroke tolerance in the mouse is mediated by erythropoietin // *Stroke.* — 2003. — Vol. 34. — P. 1981-1986.
104. Rengasamy A., Johns R.A. Determination of Km for oxygen of nitric oxide synthase isoforms // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* — 1996. — Vol. 276. — P. 30-33.
105. Stewart V.C., Sharpe M.A., Clark J.B., Heales S.J. Astrocyte-derived nitric oxide causes both reversible and irreversible damage to the neuronal mitochondrial respiratory chain // *J. Neurochem.* — 2000. — Vol. 75. — P. 694-700.
106. Su J., Groves J.T. Mechanisms of peroxynitrite interactions with heme proteins // *Inorg. Chem.* — 2010. — Vol. 49. — P. 6317-6329.
107. Suter O.C., Sunthorn T., Kraftsik R., Straubel J., Darekar P., Khalili K., Miklossy J. Cerebral hypoperfusion generates cortical watershed microinfarcts in Alzheimer disease // *Stroke.* — 2002. — Vol. 33. — P. 1986-1992.
108. Toda N., Okamura T. Cerebral blood flow regulation by nitric oxide in Alzheimer's disease // *J. Alzheimers. Dis.* — 2012. — Vol. 32, №3. — P. 569-578.
109. Toda N., Ayajiki K., Okamura T. Cerebral blood flow regulation by nitric oxide: recent advances // *Pharmacol. Rev.* — 2009. — Vol. 61. — P. 62-97.
110. Togo T., Katsuse O., Iseki E. Nitric oxide pathways in Alzheimer's disease and other neurodegenerative dementias // *Neurol. Res.* 2004. — Vol. 26. — P. 563-566.
111. Vanderkooi J.M., Erecinska M., Silver I.A. Oxygen in mammalian tissue: methods of measurement and affinities of various reactions // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* — 1991. — Vol. 260. — P. C1131-C1150.
112. Vanin A.F. Dinitrosyl iron complexes with thiolate ligands: physico-chemistry, biochemistry and physiology // *Nitric Oxide.* — 2009. — Vol. 21. — P. 1-13.
113. Yang X., Askarova S., Sheng W., Chen J.K., Sun A.Y., Sun G.Y., Yao G., Lee J.C. Low energy laser light (632.8 nm) suppresses amyloid- $\beta$  peptide-induced oxidative and inflammatory responses in astrocytes // *Neuroscience.* — 2010. — Vol. 171. — P. 859-868.
114. Zhang F., Eckman C., Younkin S., Hsiao K.K., Iadecola C. Increased susceptibility to ischemic brain damage in transgenic mice overexpressing the amyloid precursor protein // *J. Neurosci.* — 1997. — Vol. 17. — P. 7655-7661.
115. Zhang J., Dawson V.L., Dawson T.M., Snyder S.H. Nitric oxide activation of poly(ADP-ribose) synthetase in neurotoxicity // *Science.* — 1994. — Vol. 263. — P. 687-689.
116. Zong P., Setty S., Sun W., Martinez R., Tune J.D., Ehrenburg I.V., Tkatchouk E.N., Mallet R.T., Downey H.F. Intermittent hypoxic training protects canine myocardium from infarction // *Exp. Biol. Med.* — 2004. — Vol. 229. — P. 806-812.

## ***Role of nitric oxide overproduction in development of Alzheimer's disease and possibility of its prevention using adaptation to hypoxia***

**Manukhina E.B.<sup>1,3</sup>, Goryacheva A.V.<sup>1</sup>, Malyshev I.Yu.<sup>1,2</sup>, Downey H.F.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> — Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltijskaya 8, Moscow, Russian Federation, manukh@mail.ru, goryacheva@mail.ru

<sup>2</sup> — Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Delegatskaya 20/1, Russian Federation, iymalyshev1@gmail.com

<sup>3</sup> — Department of Integrative Physiology, University of North Texas Health Science Center,

3500 Camp Bowie Blvd., Fort Worth, TX 76107, USA, fred.downey@unthsc.edu

*Excessive nitric oxide (NO) production in brain has been implicated in development and progression of neurodegenerative diseases including Alzheimer's disease (AD). Direct neurotoxic effects of excessive NO are mediated by mitochondrial dysfunction and ATP depletion, apoptosis of neural cells, excitotoxicity, nitration or oxidation of proteins resulting from NO-mediated formation of reactive nitrogen and oxygen species, and damage and dysfunction of microvascular cells with ensuing disorders of cerebral circulation. Recent studies have demonstrated that adaptation to intermittent hypoxia can prevent NO overproduction, excessive protein nitration, and increased expression of all NO synthase isoforms in brain of rats with experimental AD. This prevention of NO overproduction is associated with reduced cognitive disorders, diminished loss of brain neurons, less endothelial dysfunction, and increased cerebral vascular density. Possible mechanisms for the restriction of NO overproduction by adaptation to hypoxia include 1) limitation of NO production due to inadequate NOS substrate O<sub>2</sub>; 2) moderate increase in NO level, which provides NOS feedback inhibition; 3) O<sub>2</sub> modulation of the feedback inhibition; 4) restriction of oxidative stress; and 5) binding excessive NO to NO stores. Therefore, approaches of adaptive medicine can be used as a strategy to improve neuronal self-defense mechanisms which suppress progression towards AD.*

**Key words:** adaptation to hypoxia, Alzheimer's disease, nitric oxide, neurodegeneration, beta-amyloid, cerebral blood vessels, NO stores