

## Депо оксида азота (NO) и его адаптивная роль в сердечно-сосудистой системе\*

Манухина Е.Б.<sup>1</sup>, Дауни Г.Ф.<sup>2</sup>, Маллет Р.Т.<sup>2</sup>, Малышев И.Ю.<sup>1,3</sup>, Ванин А.Ф.<sup>4</sup>

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

<sup>2</sup> — Отдел интегративной физиологии, Центр медицинских наук Университета Северного Техаса, Форт-Уэрт, США

<sup>3</sup> — Московский Государственный медико-стоматологический университет

<sup>4</sup> — Институт химической физики РАН, Москва

Оксид азота (NO) — высокоактивная субстанция с короткой продолжительностью существования. В живом организме NO претерпевает трансформацию, встраиваясь в комплекс, осуществляющий его транспорт и внутриклеточное хранение. Главными формами депонирования и транспортировки NO являются S-нитрозотиолы и динитрозольные комплексы железа. В последние годы особый интерес ученых вызывает изучение функций нитритов, особенно, их превращение в NO под воздействием гипоксии. Депо NO необходимо для того, чтобы, по одним данным, обеспечить защиту от непомерного количества свободного NO после его гиперпродукции, а по другим, служить дополнительным источником при его дефиците. Адаптация животных к перемежающейся гипоксии ассоциируется с образованием депо NO. Таким образом, перемежающаяся гипоксия может обеспечить защиту сердечно-сосудистой системы как в случае гиперпродукции NO, так и при его дефиците. Согласно одним данным, переход излишков NO в депо защищает ткани от токсического действия оксида азота и от гипотензии, связанной с избытком NO. По другим данным, депо NO может служить его резервом в случае сниженной продукции. Так, накопление и истощение депо NO играет важную роль в защите от заболеваний сердечно-сосудистой системы, связанных с избытком или дефицитом NO, а модуляция уровня оксида азота и его депо может играть важную клиническую роль.

**Ключевые слова:** оксид азота, кровеносные сосуды, доноры NO, нитрозотиолы, динитрозильный комплекс железа, адаптация, гипоксия, гипертензия, болезнь Альцгеймера.

### Синтез и депонирование NO в кровеносных сосудах

Синтез NO представляет собой пятиэлектронное окисление азота в терминальной гуанидиновой группе аминокислоты L-аргинина [38]. Эта кислородзависимая реакция протекает при участии кофакторов НАДФН, тетрагидриобиптерина (BH<sub>4</sub>), ФАД и ФМН и катализируется ферментом NO-синтазой (NOS), которая существует в трех изоформах. Изоформа NOS I (нейрональная NOS, nNOS) непрерывно экспрессируется преимущественно в центральных и периферических нейронах, хотя она также обнаруживается в некоторых эпителиальных и сосудистых гладкомышечных клетках. nNOS активируется Ca<sup>2+</sup>-зависимым связыванием кальмодулина. Изоформа NOS II (индуцибельная NOS, iNOS) в нормальных клетках отсутствует, но ее экспрессия может индуцироваться различными факторами, связанными с воспалением и свободнорадикальными процессами. В этих условиях активность iNOS может на три порядка превышать активность конститутивных изоформ NOS. Эта изоформа регулируется практически только на уровне экспрессии и не зависит от Ca<sup>2+</sup> и кальмодулина. Третья изоформа, NOS III (эндотелиальная NOS, eNOS) присутствует в эндотелиальных и некоторых других типах клеток и регулируется на транскрипционном и трансляционном уровне. Как и nNOS, eNOS является конститутивной изоформой NOS и активируется Ca<sup>2+</sup>-кальмодулином. Любой стимул, повышающий концентрацию внутриклеточного Ca<sup>2+</sup>, в течение нескольких секунд активирует NOS. К числу таких факторов относятся ацетилхо-

лин, брадикинин, серотонин, тромбин, а также такие физические факторы, как напряжение сдвига, т.е. смещение крови по отношению к стенке сосуда, и концентрация O<sub>2</sub>. Последние два фактора способны не только активировать eNOS, но и стимулировать экспрессию ее гена [27].

Эффекты NO зависят от его концентрации. В низких концентрациях NO выполняет важные регуляторные функции, опосредованные активацией растворимой гуанилатциклазы и образованием в клетках цГМФ, главными из которых в кровеносной системе являются расширение сосудов, антитромботические эффекты, регуляция работы сердца и артериального давления. В то же время NO в высоких концентрациях оказывает токсическое действие на клетки и генетический аппарат, особенно в условиях оксидативного стресса, поскольку он реагирует с супероксиданионом с образованием еще более токсичного пероксинитрита [86].

Будучи свободным радикалом, NO имеет короткую продолжительность жизни — около 6–10 с. Однако обнаружилось, что NO обладает не только аутокринным, но и паракринным действием, т.е. влияет на физиологические и биохимические процессы не только в той клетке, где он был синтезирован, но и в соседних [63, 99]. Например, вдыхаемый NO диффундирует из альвеол в кровеносное русло через легочные сосуды и вызывает расширение почечных и брыжеечных артерий [39, 107], причем эти эффекты могут быть длительными [103]. Это означает, что NO должен быть каким-то образом защищен от окисления кислородом, свободными радикалами и гемоглобином во время транспорти-

\* Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 07-04-00650) и National Institutes of Health США (грант AT-003598).

ровки к отдаленным мишеням. Такая защита обеспечивается путем включения NO в более стабильные нитрозосоединения, которые запасают NO и транспортируют его к органам и клеткам-мишеням, где он высвобождается из этих комплексов при наличии соответствующих условий. Эти нитрозосоединения образуют так называемое депо NO. Главными формами депонирования и транспортировки NO являются S-нитрозиотиилы (RS-NO) и динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ;  $\{(RS^-)_2Fe^+(NO^+)_2\}^+$ ) [117, 118, 123].

RS-NO и ДНКЖ существуют в двух формах — высокомолекулярной, связанной с тиоловыми группами белков, и низкомолекулярной, связанной с тиолами, такими как цистеин и глутатион. Высокомолекулярные комплексы значительно стабильнее, чем низкомолекулярные, и именно они, как считается, образуют главное внутриклеточное депо NO, тогда как низкомолекулярные комплексы служат преимущественно для транспортировки NO. Повышение локальной концентрации низкомолекулярных тиолов смещает равновесие в сторону низкомолекулярных ДНКЖ. В этих условиях стабильность связанных с белками ДНКЖ снижается, и они начинают медленно высвобождать NO [104, 117]. RSNO образуются, главным образом, из ДНКЖ путем транснаитрозилирования тиолов. Поэтому образование RSNO практически не зависит от уровня кислорода и синтеза NO [26].

Гемоглобин (Hb) также может связывать NO и служить дополнительным депо NO. Хотя NO быстро окисляется оксигенированным гемоглобином (Hb), NO реагирует с деоксигенированными гемовыми группами с образованием в капиллярной крови  $\beta HbFe^{2+}NO$ , а также с  $^{93}S$ -остатками  $\beta$ -цепи Hb с образованием S-нитрозогемоглобина (SNO-Hb) [71]. В условиях гипоксии и ишемии SNO-Hb может служить важным источником биоактивного NO, поскольку при падении  $PO_2$  ниже 6 мм рт. ст. NO высвобождается из  $^{93}S$ -остатков в достаточном количестве для расширения сосудов [28, 57, 71, 103]. При физиологическом  $PO_2$  Hb необратимо окисляет NO и образует только очень небольшое количество SNO-Hb. Более того, SNO-Hb в эритроцитах нестабилен [43]. Поэтому объем депо NO, которое может образоваться в нормоксических условиях, очень мал [51]. Кроме того, существует ряд барьеров между участками образования NO и Hb, включая мембрану эритроцитов [49, 119], непроницаемый слой вокруг эритроцитов [69] и зона плазмы, свободная от эритроцитов, вдоль люминальной поверхности сосудистого эндотелия [66]. Наличие этих барьеров снижает возможность захвата NO гемоглобином в 500—1000 раз [31, 119]. Все это делает роль Hb как возможного депо NO незначительной, особенно в условиях нормоксии.

В 1994 г. две группы исследователей одновременно сообщили о том, что нитрит ( $NO_2^-$ ) может быть субстратом NOS-независимой генерации NO *in vivo* [25, 94]. Доказано, что  $NO_2^-$  может восстанавливаться до биоактивного NO внутрисосудистыми и тканевыми нитритредуктазами в условиях снижения напряжения кислорода при участии НАДН, НАДФН, флавопротеинов и цитохромоксидазы в митохондриях, цитохрома P450 в эндоплазматическом ретикулуме или дезоксигемоглобина в эритроцитах [15, 31, 73]. Восстановление  $NO_2^-$  до NO продемонстрировано в сосудистой гладкой мышце [50], эндотелии [85] и ишемизированном миокарде [32, 34].

## Выявление и оценка депо NO в тканях

В 1961 г., еще до открытия эндотелийзависимого расслабления кровеносных сосудов Furchgott с соавторами показали, что предварительно сокращенная аорта кролика расслабляется под действием света, и предположили, что эта фоторелаксация вызвана «комплексом металла типа железа и белков» [40]. Позднее Venturini с соавторами подтвердили, что фоторелаксация сосудов опосредована высвобождением NO из депо, находящегося в стенке сосуда. Это депо было истощаемо, но могло восполняться при инкубации сосуда с донором NO в темноте [82, 83, 120]. В регенерации этого фоточувствительного депо NO важную роль играли внутриклеточные тиолы [82, 83].

Аналогичная динамика высвобождения NO наблюдалась при облучении брыжеечных сосудов ультрафиолетом [55]. Возникающее при этом расслабление сосудов можно было блокировать ингибитором растворимой гуанилатциклазы РТЮ или ловушкой NO оксигемоглобином, но не ингибитором NOS L-NMMA.

Депо NO в форме низкомолекулярных и связанных с белками ДНКЖ можно обнаружить путем регистрации их сигнала ЭПР (электронного парамагнитного резонанса) при комнатной температуре [36, 113, 116].

Еще один способ обнаружения депо NO — это газовая хемилюминесценция [70]. Инкубация легочной артерии и эритроцитов кролика с донором NO приводит к образованию депо NO, которое выявляется, в основном, в субклеточных фракциях, содержащих растворимую гуанилатциклазу. Однако поскольку авторы не нашли корреляции между субклеточным связыванием и концентрацией NO, они предположили, что часть NO может связываться в комплексы, которые невозможно обнаружить этим методом.

Гистохимические исследования позволили визуально обнаружить депо NO [37]. Окрасивание клеток на кластеры  $Fe^{2+}$  показало, что депо NO при инкубации с донорами NO накапливается в эндотелии и изредка в клетках гладкой мышцы, прилегающих к эндотелию. Позднее аналогичные результаты были получены с использованием иммуногистохимического окрасивания на S-нитрозилированные цитеиновые остатки [19].

В последние годы для выявления и оценки объема депо NO в стенке кровеносных сосудов чаще всего применяется физиологический метод, основанный на способности низкомолекулярных тиолов, обычно N-ацетилцистеина (N-АЦ), проникать в клетку и реагировать с белковым депо с образованием низкомолекулярных RS-NO и ДНКЖ, которые, в свою очередь, высвобождают NO. N-АЦ вызывает расслабление изолированных сосудов, предварительно инкубированных с донором NO [20, 88], а также после индукции массивного синтеза NO липополисахаридами [87, 88]. ЭПР-анализ подтвердил, что индукция iNOS липополисахаридами в изолированной аорте формирует депо NO. В присутствии ингибиторов NOS эта реакция отсутствует [58, 89].

Еще один подход, который используется для выявления ДНКЖ в сосудистой стенке и других тканях, основан на реакции диэтилдитиокарбамата (ДЭТК) с ДНКЖ и S-нитрозиотиолами. В результате этой реакции высвобождается RS-NO и, в конечном счете, NO который вызывает расслабление сосудов, пропорциональное объему депо NO [16, 89]. ДЭТК-чувствительное депо NO обычно локализуется преимущественно в эндотелии; однако при повреждении эндотелия гладкая мышца также может депонировать NO. Это депо

NO истощаемо, поскольку для повторного получения реакции расслабления в ответ на ДЭТК требуется инкубация с донором NO, во время которой депо NO восполняется [16].

Модификация этого метода позволила выявить и оценить депо NO в целом организме бодрствующего животного [10]. В этих экспериментах повышение уровня NO вызывали стимулированием эндогенного синтеза NO путем теплового шока или путем введения донора NO. Высвобождение NO из сформировавшегося депо регистрировалось по снижению АД крысы в ответ на введение ДЭТК в присутствии ингибитора NOS L-NNA, а затем документировалось путем регистрации характерного ЭПР-сигнала ДНКЖ в аорте, печени, почках, сердце и мозге.

Эффективность депонирования NO или потенциальную емкость депо NO можно оценить по максимальному количеству NO, которое может быть связано в депо изолированного сосуда при его инкубации с избытком донора NO. После такой инкубации и отмывки объем депо NO определяют по величине реакции расслабления сосуда на ДЭТК или N-АЦ [1, 2].

Обычно депо NO в сосудистой стенке удается выявить с помощью ДЭТК только после стимулирования эндогенного синтеза NO или инкубации сосуда с донором NO [16, 19, 89]. Однако недавно было показано, что использование N-АЦ в сочетании с высокочувствительной микрографической регистрацией позволяет обнаружить депо NO в стенке коронарной и базилярной артерий в покое [5]. В настоящее время N-АЦ считается более эффективным и безопасным средством для выявления депо NO, чем ДЭТК. Обнаружено два пула депо NO, один из которых реагирует как с ДЭТК, так и с N-АЦ, а второй — только с N-АЦ [1]. При этом ингибирование гуанилатциклазы полностью блокирует реакцию сосуда на ДЭТК и уменьшает ответ на N-АЦ на величину расслабления, вызванного ДЭТК. Предполагается, что ДЭТК взаимодействует, главным образом, с жирорастворимым (мембраносвязанным) пулом депо NO, тогда как N-АЦ взаимодействует как жирорастворимым, так и с водорастворимым пулом [1].

### Влияние гипоксии на синтез NO и формирование депо NO

Гипоксия может влиять на продукцию NO, концентрацию NO в тканях и экспрессию NOS посредством нескольких механизмов:

1. *Ограничение продукции NO за счет дефицита  $O_2$  как субстрата NOS.* Глубокая гипоксия (0,1–0,2%  $O_2$ ) снижает продукцию NO в культуре клеток в результате ингибирования всех трех изоформ NOS на 60–80% [18, 65]. Менее тяжелая гипоксия (4,8%  $O_2$ ) вызывает лишь умеренное угнетение синтеза NO, и этот эффект гипоксии может компенсироваться увеличением поступления в клетку  $Ca^{2+}$ , который активирует  $Ca^{2+}$ /кальмодулин-зависимые eNOS и nNOS. При тяжелой гипоксии этот компенсаторный механизм не работает, и развивается дефицит NO [45, 46].

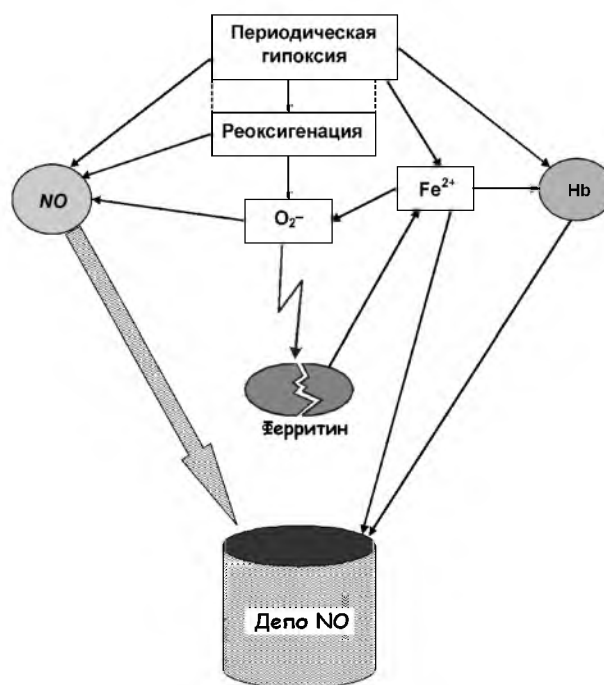
2. *Концентрация  $O_2$  влияет на ингибирование NOS оксидом азота по механизму отрицательной обратной связи,* поскольку  $O_2$  и NO конкурируют за гемовое железо. NO может связываться с  $NOSFe^{2+}$  с образованием инактивирующего NOS комплекса гем-NO ( $NOSFe^{2+}NO$ ) [18, 65]. Когда концентрация  $O_2$  снижается, меньше NO вытесняется из комплекса NO с гемовым железом, и продукция NO уменьшается. Именно поэтому NOS производит NO в количестве, пропорциональном  $O_2$  в физиологическом диапазоне (0–250 мкМ) [110].

3. *Напряжение  $O_2$  регулирует биодоступность NO.* При значительном повышении  $PO_2$  концентрация NO может снижаться за счет окисления NO до  $NO_2^-$  и  $NO_3^-$ . Напротив, биодоступность NO увеличивается, когда продукция NO снижается в условиях гипоксии [48].

4. *Гипоксия индуцирует фактор HIF-1 и другие факторы транскрипции NOS.* При гипоксии HIF-1 активирует ряд генов, включая гены, вовлеченные в синтез NO, эритропоэз, ангиогенез, гликолиз и клеточную пролиферацию [100]. В последовательности генома iNOS [84], eNOS [42, 47] и nNOS [38] был обнаружен регуляторный участок HRE, который указывает на возможность регуляции экспрессии этих генов HIF-1.

5. *Гипоксия индуцирует ряд NOS-регулирующих белков теплового шока (HSPs),* включая HSP27 [52], HSP32 [53], HSP70 [52, 75, 90] и HSP90 [21]. HSP90 прямо активирует eNOS и ограничивает образование супероксиданиона в процессе синтеза NO [23, 41].

На рисунке показаны возможные механизмы формирования депо NO в условиях периодической гипоксии. Во время каждого сеанса реоксигенации, сменяющего период гипоксии, происходит активация свободнорадикальных процессов. Свободные радикалы, в частности супероксиданион, дозозависимо стимулируют образование депо NO в форме RSNO [26]. Другим механизмом, также связанным с активацией свободнорадикальных процессов, является стимулированное гипоксией увеличение поступления свободного железа в организм [101], от которого прямо зависит образование ДНКЖ и RSNO [26, 67, 111]. Кроме того, супероксидрадикалы вызывают высвобождение  $Fe^{2+}$  из железосодержащего белка ферритина [91].  $Fe^{2+}$  не только способствует формированию депо NO, но и транзиторно активирует синтез NO, что, возможно, связано с повреждением клеточной мембраны, позволяющим проникать в клетку дополнительному  $Ca^{2+}$ , который активирует конститутивные изоформы NOS [60].



Возможные механизмы формирования депо NO при адаптации к гипоксии. Пояснения в тексте.  $O_2^-$  = супероксиданион, Hb = гемоглобин

Адаптация к гипоксии стимулирует синтез Hb [96]. Проникая в эритроцит, NO реагирует с оксигемоглобином с образованием метгемоглобина и нитрата, связывается с гемовой группой дезоксигемоглобина с образованием NO-Hb или реагирует с <sup>93</sup>SuS гемоглобиновой цепи β-глобина с образованием S-нитрозированного производного оксигемоглобина [56, 94]. Таким образом, гипоксическое увеличение синтеза Hb может рассматриваться как увеличение потенциального депо NO.

Наконец, при адаптации к периодической гипоксии в плазме увеличивается количество стабильных метаболитов NO — NO<sub>2</sub><sup>-</sup> и NO<sub>3</sub><sup>-</sup> [77, 79], а нитриты, как уже указывалось выше, могут служить важными дополнительными неферментативными источниками NO, т.е. депо NO, а не просто маркерами повышенного уровня NO в организме [25, 72, 109].

### Роль депо NO в защитных эффектах адаптации к гипоксии

Для изучения формирования депо NO и его физиологической роли в организме часто используется адаптация к периодической гипобарической или нормобарической гипоксии, которая эффективно стимулирует синтез NO [см. обзоры 77, 79]. В одной из моделей крыс помещают в гипобарическую барокамеру на симулированную «высоту» 4000 м. Продолжительность гипоксии постепенно увеличивают с 10 мин до 5 ч в день; суммарная длительность адаптации составляет 40 дней. К концу такой адаптации продукция NO увеличивается в два раза и при этом достоверно коррелирует с объемом депо NO [78].

Образование и прогрессивное нарастание в объеме депо NO, очевидно, является адаптивным механизмом, направленным на защиту сердечно-сосудистой системы от повреждающего эффекта избытка NO, который может образоваться при повторных гипоксических воздействиях. Одновременно депо NO может служить дополнительным источником свободного NO, способного компенсировать его недостаток.

Роль депо NO в защите от гиперпродукции NO изучалась во многих исследованиях [17, 79, 121]. Первые данные, подтверждающие такую возможность, были получены на модели теплового шока, который сопровождается резким увеличением синтеза NO, вызывающим острую гипотензию и 50% смертность крыс [7]. Предварительное формирование депо NO с помощью адаптации к стрессу или введения донора NO предупреждало гиперпродукцию NO и падение АД при последующем тепловом шоке [17].

Невозможность сформировать депо NO или его хроническое истощение в процессе адаптации к гипоксии препятствует развитию адаптационной защиты. Если в процессе адаптации образование депо NO блокировали небольшими, невазоактивными дозами ингибитора NOS [17], или систематически опустошали его путем введения N-АЦ [59, 97], защитный эффект не развивался.

Дальнейшие доказательства защитной роли депо NO при гиперпродукции NO были получены на модели болезни Альцгеймера у крыс, которая создавалась путем введения в мозг крыс токсичного фрагмента β-амилоида [9]. Известно, что развитие болезни Альцгеймера сопровождается токсическим действием избытка NO, гиперпродукцируемого нейронами и глией, на нейроны и сосуды мозга [106]. Гиперпродукция NO, вызванная введением

Аβ, подтверждалась повышенным уровнем нитратов и нитритов в ткани мозга NO, а защитный эффект адаптации к гипоксии проявлялся как в уменьшении нейродегенеративного повреждения и гибели нейронов в коре мозга, так и в предупреждении нарушения памяти, типичного для болезни Альцгеймера [4, 8]. Локальный мозговой кровоток непрерывно регистрировали в теменной коре наркотизированных крыс с помощью лазерного доплеровского флоуметра. У крыс, получивших инъекцию Аβ, N-АЦ вызывал транзиторное увеличение мозгового кровотока, что свидетельствовало о высвобождении NO из депо NO в сосудистой стенке. У крыс, предварительно адаптированных к гипоксии, объем депо NO, сформировавшегося после введения Аβ, был значительно больше, чем у неадаптированных крыс [9]. Это позволило предположить, что адаптация к гипоксии увеличивает «емкость» депо NO, т.е. обеспечивает возможность связывания большего количества NO в депо и тем самым защиту от его избытка.

Защитный эффект адаптации к гипоксии от нарушений, связанных с дефицитом или снижением биодоступности NO, был продемонстрирован на примере спонтанной гипертензии у крыс [11, 12], а также у больных гипертензией [3]. Адаптация к гипоксии, начатая на стадии ранней гипертензии (в возрасте 5–6 недель), достоверно замедляет прогрессирование гипертензии у крыс линии SHR и SHRSP и предупреждает развитие дисфункции эндотелия. Этот защитный эффект сопровождается улучшением продукции NO и формированием депо NO в сосудистой стенке. Адаптация, проведенная на фоне ингибитора NOS или диэтилдитиокарбамата — препарата, разрушающего депо NO — защитного действия не оказывает [114].

Курсовое введение крысам SHR и SHRSP «экзогенного депо NO» — ДНКЖ обладает действием, аналогичным действию адаптации к гипоксии. После однократного внутривенного введения ДНКЖ распределяется по органам и тканям и оказывает гипотензивное действие, которое зависит от дозы и времени и тесно коррелирует с содержанием ДНКЖ в тканях [6, 62, 114]. Образование тканевого депо NO в форме ДНКЖ, связанных с белками, происходит при переносе групп Fe(NO)<sub>2</sub> с низкомолекулярного экзогенного ДНКЖ на тканевые белки. Гипотензивный эффект обусловлен обратным переносом групп Fe<sup>+</sup>(NO<sup>+</sup>)<sub>2</sub> с белков на более мобильные низкомолекулярные лиганды [62, 114, 115].

В течение длительного времени NO<sub>2</sub><sup>-</sup> считался биологически инертным в тех концентрациях, которые присутствуют в плазме и тканях. Однако последние исследования значительно увеличили интерес к NO<sub>2</sub><sup>-</sup> как к возможному дополнительному депо NO, который может высвобождать NO при гипоксии [33, 34, 74]. Источниками NO<sub>2</sub><sup>-</sup> в организме могут служить:

- 1) пища, особенно переработанные мясные продукты и некоторые овощи;
- 2) бактерии, превращающие поступающий с пищей NO<sub>3</sub><sup>-</sup> в NO<sub>2</sub><sup>-</sup> в пищеварительном тракте;
- 3) NO, который окисляется до NO<sub>2</sub><sup>-</sup> [109].

Преобразование NO<sub>2</sub><sup>-</sup> в NO может происходить под действием ряда факторов и ферментов, обладающих нитроредуктазной активностью, включая дезоксигемоглобин, ксантиноксидоредуктазу, миоглобин и eNOS. Поскольку O<sub>2</sub> препятствует восстановлению NO<sub>2</sub><sup>-</sup> до NO, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> образует NO только в условиях гипоксии [64, 112]. Благо-

даря этому NOS-независимое образование NO из NO<sub>2</sub><sup>-</sup> может обеспечивать защитное действие при патологических состояниях сопровождающихся гипоксией. Действительно, показано, что NO<sub>2</sub><sup>-</sup> уменьшает размер инфаркта при ишемическом и реперфузионном повреждении [24, 29, 34], дозозависимо ограничивает развитие NO-дефицитной гипертензии [108], предупреждает отставленный цереброваскулярный спазм на модели субарахноидальной геморрагии [92]. Депо NO в виде NO<sub>2</sub><sup>-</sup> может играть важную роль в защитных эффектах адаптации к гипоксии, поскольку она сопровождается значительным повышением уровня NO<sub>2</sub><sup>-</sup> и NO<sub>3</sub><sup>-</sup> в плазме [см. обзоры 77, 79].

#### **Возможные механизмы участия депо NO в сердечно-сосудистой адаптации и регуляция депонирования NO**

Как интенсивность продукции NO в организме, так и эффективность депонирования NO предопределены генетически [14]. Различия между степенью депонирования NO были продемонстрированы на крысах линий, обладающих разным врожденным уровнем синтеза NO. При этом использовался показатель «потенциальной емкости» депо NO, который отражает эффективность депонирования NO и рассчитывается как максимальное количество NO которое может быть депонировано при инкубации изолированного сосуда с донором NO [2].

При сопоставлении спонтанно-гипертензивных крыс SHRSP, обладающих сниженным уровнем продукции NO, и нормотензивных контрольных крыс WKY в условиях адаптации к гипоксии или курсового введения ДНКЖ наблюдались два важных эффекта [11]. Во-первых, адаптация к гипоксии сопоставимо увеличивала выделение с мочой NOx, т.е. стимулировала синтез NO у крыс обеих линий. При этом АД снижалось у SHRSP, но не изменялось у WKY [12, 77, 80, 114]. Аналогичная ситуация наблюдалась при курсовом введении донора NO [11]. Во-вторых, депо NO формировалось в сосудах крыс обеих линий, однако у WKY оно было вдвое больше, чем у SHRSP. Причина этого состоит в значительно более низкой эффективности депонирования NO у SHRSP по сравнению с WKY [2]. Связь между уровнем NO, величиной депо NO и АД можно предположительно представить следующим образом. При повышении концентрации NO, независимо от вызвавшей его причины (введение донора NO или стимулирование эндогенного синтеза NO при адаптации к гипоксии), часть избытка NO связывается в относительно стабильное депо, а оставшая часть, т.е. свободный NO, вызывает вазодилатацию и оказывает гипотензивное действие. При низкой эффективности депонирования, как у SHRSP, количество несвязанного NO меньше, а объем сформировавшегося депо больше, тогда как при более высокой эффективности депонирования, как у WKY, наблюдается обратная ситуация. Можно предположить, что у SHRSP депонирование в форме ДНКЖ снижено за счет более высокой активности свободнорадикальных процессов [22], поскольку свободные радикалы являются ключевым фактором перехода NO из ДНКЖ в RSNO, которые обладают вазодилатирующим действием [26].

Нарушение способности к депонированию избытка NO наблюдалось также в коронарных сосудах у собак с метаболическим синдромом [76]. Гиперпродукция NO, характерная для этого состояния [54], вызывает образование в сосудистой стенке небольшого депо NO. Однако «потенциальная емкость» этого депо значительно ниже, чем у здоровых собак, и ее, по-видимому, недостаточно для защиты коронарных со-

судов от токсического действия избытка NO, который является одной из причин повреждения и дисфункции эндотелия коронарных сосудов при метаболическом синдроме [54].

У крыс Август, обладающих врожденно повышенным уровнем продукции NO [13], адаптация к гипоксии, как и у крыс Вистар, вызывает увеличение NOx в плазме [14, 81]. Однако это увеличение NOx в ходе 40-дневной адаптации у Август развивается медленнее, чем у Вистар, и в результате к концу курса адаптации уровень NOx у Август оказывается ниже, несмотря на более высокий исходный уровень. Это происходит за счет более эффективного формирования депо NO у Август, которое к концу курса адаптации достигает почти вдвое большего размера, чем у Вистар [14, 81]. Таким образом, крысы Август отличаются не только более интенсивным синтезом NO, но и большей эффективностью депонирования NO при стимулировании его синтеза.

Интересно отметить, что при сравнении устойчивости крыс Вистар и Август к образованию стрессорных язв желудка, которая в большой степени зависит от доступности достаточного количества NO [35], оказалось, что Август значительно устойчивее Вистар [14, 81]. 6-дневная адаптация к гипоксии оказывала защитный эффект у крыс обеих линий, однако после 40 дней адаптации суммарная площадь язв желудка, вызванных иммобилизационным стрессом, не уменьшилась, а, напротив, увеличилась по сравнению с неадаптированными крысами, причем этот потенцирующий эффект был значительно больше выражен у Август, чем у Вистар (площадь язвенных поражений увеличилась на 85 и 23% соответственно) [14, 81]. Авторы связывают этот эффект с интенсивным депонированием NO, которое могло создать локальный дефицит свободного NO, предрасполагающий к вазоконстрикции и язвообразованию в слизистой желудка. Эти данные впервые указывают на возможность избыточного депонирования NO, которое может в определенных условиях оказаться неблагоприятным фактором [14].

Поскольку выяснилось, что эффективность депонирования NO прямо коррелирует с уровнем продукции NO, было выдвинуто предположение о возможности направленного модулирования емкости депо NO путем хронического изменения уровня NO в организме [2]. У крыс Вистар хроническое повышение уровня NO, вызванное адаптацией к гипоксии и курсовым введением донора NO, увеличивало, а хроническое ингибирование синтеза NO, напротив, уменьшало потенциальную емкость депо NO. При этом у SHRSP влияние хронического повышения уровня NO на эффективность депонирования NO оказалось значительно меньше, чем у Вистар, тогда как у Август потенциальная емкость депо NO была устойчивее к хроническому введению ингибитора NO-синтазы. Повышение эффективности депонирования NO при адаптации к высоким концентрациям NO, по-видимому, защищает сосуды от цитотоксического и чрезмерного вазодилаторного действия избытка NO. В то же время, увеличение потенциальной емкости депо NO при дефиците NO позволяет ограничить связывание NO в комплексы и способствует поддержанию NO-зависимых физиологических процессов, таких как вазодилатация, предупреждение тромбообразования, антимикробная и противоопухолевая защита и нервная передача.

Нарушение способности адаптироваться к изменениям продукции NO, которое наблюдалось у SHRSP, может способствовать повреждению сосудов, инактивации eNOS и дисфункции эндотелия, связанным с гиперпродукцией NO в сосудистых гладких мышцах у спонтан-

но-гипертензивных крыс [122]. Напротив, высокая эффективность депонирования NO у крыс Август позволяет им быстрее, чем крысам Вистар, удалять из плазмы крови избыток NO при его гиперпродукции [14] и обеспечивает устойчивость как к длительному повышению, так и снижению уровня NO в организме.

Механизм адаптивного изменения эффективности депонирования NO еще предстоит выяснить. Можно лишь предположить, что в основе этого явления лежит стимулирующее действие NO на синтез низкомолекулярных тиолов и/или NO-зависимое повышение биодоступности свободного железа. Действительно, показано, что NO регулирует метаболизм и транспорт цистеина — основного предшественника глутатиона [44]. Доноры NO оказывают прямое стимулирующее действие на синтез глутатиона [61, 102]. После транзитного снижения внутриклеточного пула тиолов (глутатиона, гамма-глутамилцистеина и цистеина) под действием NO происходит их значительное накопление [95]. Еще одним результатом хронического, но не острого воздействия повышенных концентраций NO на клетки является увеличение пула свободного железа [67, 93]. По-видимому, это связано с влиянием NO на экспрессию белков, вовлеченных в метаболизм железа, в частности, IRP1 [68]. Все это может способствовать эффективному депонированию NO при его избытке в среде. Напротив, ингибиторы NO-синтазы уменьшают уровень цистеина и глутатиона в тканях [102], что может служить механизмом снижения эффективности депонирования при хроническом дефиците NO.

Таким образом, компенсаторное изменение способности сосудов к депонированию NO в зависимости от его уровня в организме представляет собой новый механизм адаптации сердечно-сосудистой системы к условиям хронического избытка или дефицита NO. Направленное модулирование депонирования NO может иметь клиническое значение, поскольку этот процесс играет роль в предупреждении нарушений, связанных как с избытком, так и с дефицитом NO. Еще одним перспективным с клинической точки зрения аспектом направленного модулирования эффективности депонирования NO является то, что формирование депо NO в результате предварительного воздействия доноров NO может восстанавливать защитный эффект NO в сосудах после развития толерантности к органическим нитратам [98].

### Список литературы

1. Власова М.А., Ванин А.Ф., Мюллер Б., Смирин Б.В., Малышев И.Ю., Манухина Е.Б. Выявление и характеристика разных пулов депо оксида азота в стенке сосуда // Бюлл. экспер. биол. и мед. — 2003. — Т. 136, №9. — С. 260—264.
2. Власова М.А., Смирин Б.В., Покидышев 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.
3. Лямина Н.П., Сенчихин В.Н., Покидышев Д.А., Манухина Е.Б. Нарушение продукции NO у мужчин молодого возраста с артериальной гипертензией и немедикаментозный метод ее коррекции // Кардиология. — 2001. — №9. — С. 17—21.
4. Манухина Е.Б., Горячева А.В., Барсков И.В., Викторов И.В., Гусева А.А., Пшенникова М.Г., Хоменко И.П., Машина С.Ю., Покидышев 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.
5. Манухина Е.Б., Каленчук В.У., Гаврилова С.А., Горячева А.В., Малышев И.Ю., Кошелев В.Б. Органоспецифичность депонирования оксида азота в стенках кровеносных сосудов при адаптации к гипоксии // Росс. физиол. журнал им. И.М. Сеченова. — 2008. — Т. 94, №2. — С. 198—205.
6. Манухина Е.Б., Малышев И.Ю., Маленюк Е.Б., Зенина Т.А., Покидышев Д.А., Микоян В.Д., Кубрина Л.Н., Ваннин А.Ф. Гипотензивное действие и тканевое распределение донора оксида азота — динитрозильных комплексов железа // БЭБиМ. — 1998. — Т. 125, №1. — С. 30—33.
7. Манухина Е.Б., Покидышев Д.А., Малышев И.Ю. Предупреждение острой гипотензии и гиперактивации эндотелия при тепловом шоке с помощью адаптации к стрессорным воздействиям // БЭБиМ. — 1997. — Т. 123, №10. — С. 380—384.
8. Манухина Е.Б., Пшенникова М.Г., Горячева А.В., Хоменко И.П., Машина С.Ю., Покидышев 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. Машина С.Ю., Ванин А.Ф., Сереженков В.А., Кубрина Л.Н., Маленюк И.В., Малышев И.Ю., Манухина Е.Б. Выявление и оценка депо NO в организме бодрствующей крысы // Бюлл. экспер. биол. и мед. — 2003. — Т. 136, №7. — С. 32—36.
11. Машина С.Ю., Покидышев Д.А., Марков Х.М., Малышев И.Ю., Манухина Е.Б. Фармакологическая и нефармакологическая коррекция дисфункции эндотелия у спонтанно-гипертензивных крыс. — Дисфункция эндотелия: экспериментальные и клинические исследования. II Международная научно-практическая конференция / Ред. Г.И. Сидоренко, А.П. Солодков, В.И. Шебеко, Ю.Я. Родионов. — ВГМУ, 2002. — С. 19—22.
12. Машина С.Ю., Смирин Б.В., Малышев И.Ю., Лямина Н.П., Сенчихин В.Н., Покидышев Д.А., Манухина Е.Б. Коррекция NO-зависимых сердечно-сосудистых нарушений с помощью адаптации к гипоксии // Российский физиол. журнал им. И.М. Сеченова. — 2001. — Т. 87, №1. — С. 110—117.
13. Микоян В.Д., Кубрина Л.Н., Манухина Е.Б., Малышева Е.В., Малышев И.Ю., Ванин А.Ф. Различия в стимуляции синтеза NO при тепловом шоке у крыс генетически различных популяций // Бюлл. экспер. биол. и мед. — 1996. — №6. — С. 634—637.
14. Пшенникова М.Г., Смирин Б.В., Бондаренко О.Н., Малышев И.Ю., Манухина Е.Б. Депонирование оксида азота у крыс разных генетических линий и его роль в антистрессорном эффекте адаптации к гипоксии // Российский физиол. журнал им. И.М. Сеченова. — 2000. — Т. 86, №2. — С. 174—181.
15. Реутов В.П., Сорокина Е.Г. NO-синтазная и нитритредуплектазная компоненты цикла оксида азота // Биохимия. — 1998. — Т. 63, №7. — С. 1029—1040.
16. Смирин Б.В., Ванин А.Ф., Малышев И.Ю., Покидышев Д.А., Манухина Е.Б. Депонирование оксида азота в кровеносных сосудах in vivo // Бюлл. экспер. биол. и мед. — 1999. — Т. 127, №6. — С. 629—632.
17. Смирин Б.В., Покидышев Д.А., Малышев И.Ю., Ваннин А.Ф., Манухина Е.Б. Депонирование оксида азота как фактор адаптационной защиты // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. — 2000. — Т. 86, №4. — С. 447—454.
18. 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.
19. Alencar J.L., Lobysheva I., Geffard M., Sarr M., Schott C., Schini-Kerth V.B., Nepveu O., Stoclet J.C., Muller B. Role of S-nitrosation of cysteine residues in long-lasting inhibitory effect of nitric oxide on arterial tone // Mol. Pharmacol. — 2003. — Vol. 63. — P. 1148—1158.
20. Alencar J.L., Stoclet J.C., Muller B. Formation of releasable NO stores on tissue thiols in blood vessels: differential effect of NO donors // Fund. Clin. Pharmacol. — 2001. — Vol. 15. — P. 085.
21. Almgren C.M., Olson L.E. Moderate hypoxia increases heat shock protein 90 expression in excised rat aorta // J. Vasc. Res. — 1999. — Vol. 36. — P. 363—371.



22. Alvarez M.C., Caldiz C., Fantinelli J.C., Garciarena C.D., Console G.M., Chiappe de Cingolani G.E., Mosca S.M. Is cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats the cause or the consequence of oxidative stress? // *Hypertens. Res.* — 2008. — Vol. 31. — P. 1465–1476.
23. Amour J., Brzezinska A.K., Weihrauch D., Billstrom A.R., Zilonka J., Krolikowski J.G., Bienengraeber M.W., Wartier D.C., Pratt P.F. Jr., Kersten J.R. Role of heat shock protein 90 and endothelial nitric oxide synthase during early anesthetic and ischemic preconditioning // *Anesthesiology.* — 2009. — Vol. 110. — P. 317–325.
24. Baker J.E., Su J., Fu X., Hsu A., Gross G.J., Tweddell J.S., Hogg N. Nitrite confers protection against myocardial infarction: role of xanthine oxidoreductase, NADPH oxidase and  $K_{ATP}$  channels // *J. Mol. Cell. Cardiol.* — 2007. — Vol. 43. — P. 437–444.
25. Benjamin N., O'Driscoll F., Dougall H., Duncan C., Smith L., Golden M., McKenzie H. Stomach NO synthesis // *Nature.* — 1994. — Vol. 368. — P. 502.
26. Bosworth C.A., Toledo J.C. Jr., Zmijewski J.W., Li Q., Lancaster J.R. Jr. Dinitrosyliron complexes and the mechanism(s) of cellular protein nitrosothiol formation from nitric oxide // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2009. — Vol. 106. — P. 4671–4676.
27. Bruckdorfer R. The basics about nitric oxide // *Mol. Aspects Med.* — 2005. — Vol. 26. — P. 3–31.
28. Buehler P.W., Alayash A.I. Oxygen sensing in the circulation: «cross talk» between red blood cells and the vasculature // *Antioxid. Redox Signal.* — 2004. — Vol. 6. — P. 1000–1010.
29. Calvert J.W., Lefler D.J. Myocardial protection by nitrite // *Cardiovasc. Res.* — 2009. — Vol. 83. — P. 195–203.
30. Chen J.X., Meyrick B. Hypoxia increases Hsp90 binding to eNOS via PI3K-Akt in porcine coronary artery endothelium // *Lab. Invest.* — 2004. — Vol. 84. — P. 182–190.
31. Dejam A., Hunter C.J., Schechter A.N., Gladwin M.T. Emerging role of nitrite in human biology // *Blood Cells Mol. Dis.* — 2004. — Vol. 32. — P. 423–429.
32. Demoncheaux E.A.G., Higenbottam T.W., Foster P.J., Borland C.D.R., Smith A.P.L., Marriott H.M., Bee D., Akamine S., Davies M.B. Circulating nitrite anions are a directly acting vasodilator and are donors for nitric oxide // *Clin. Sci.* — 2002. — Vol. 102. — P. 77–83.
33. 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.
34. Duranski M.R., Greer J.J., Dejam A., Jaganmohan S., Hogg N., Langston W., Patel R.P., Yet S.F., Wang X., Kevil C.G., Gladwin M.T., Lefler D.J. Cytoprotective effects of nitrite during in vivo ischemia-reperfusion of the heart and liver // *J. Clin. Invest.* — 2005. — Vol. 115. — P. 1232–1240.
35. Elliott S.N., Wallace J.L. Nitric oxide: a regulator of mucosal defense and injury // *J. Gastroenterol.* — 1998. — Vol. 33. — P. 792–803.
36. Fichtlscherer B., Mulsch A. MR imaging of nitrosyl-iron complexes: experimental study in rats // *Radiology.* — 2000. — Vol. 216. — P. 225–231.
37. Flitney F.W., Megson I.L., Flitney D.E., Butler A.R. Iron-sulphur cluster nitrosyls, a novel class of nitric oxide generator: mechanism of vasodilator action on rat isolated tail artery // *Br. J. Pharmacol.* — 1992. — Vol. 107. — P. 842–848.
38. Forstermann U., Bissel J.-P., Kleinert H. Expressional control of the «constitutive isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III) // *FASEB J.* — 1998. — Vol. 12. — P. 773–790.
39. Fox-Robichaud A., Payne D., Hasan S.U., Ostrovsky L., Fairhead T., Reinhardt O., Kubes P. Inhaled NO as a viable antiadhesive therapy for ischemia/reperfusion injury of distal microvascular beds // *J. Clin. Invest.* — 1998. — Vol. 101. — P. 2497–2505.
40. Furchgott R.E., Ehrreich S.J., Greenblatt E. The photoactivated relaxation of smooth muscle of rabbit aorta // *J. Gen. Physiol.* — 1961. — Vol. 44. — P. 499–519.
41. Garcia-Cardena G., Fan R., Shah V., Sorrentino R., Cirino G., Papapetropoulos A., Sessa W.C. Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90 // *Nature.* — 1998. — Vol. 392. — P. 821–824.
42. Gess B., Schrickler I.K., Pfeifer I.M., Kurtz A. Acute hypoxia upregulates NOS gene expression in rats // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* — 1997. — Vol. 273. — R905–R910.
43. Gladwin M.T., Wang X., Reiter C.D., Yang B.K., Vivas E.X., Bonaventura C., Schechter A.N. S-Nitrosohemoglobin is unstable in the reductive erythrocyte environment and lacks  $O_2/NO$ -linked allosteric function // *J. Biol. Chem.* — 2002. — Vol. 277. — P. 27818–27828.
44. Gukasyan H.J., Kannan R., Lee V.H., Kim K.J. Regulation of L-cystine transport and intracellular GSH level by a nitric oxide donor in primary cultured rabbit conjunctival epithelial cell layers // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* — 2003. — Vol. 44. — P. 1202–1210.
45. 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.
46. Hampl V., Herget J. Role of nitric oxide in the pathogenesis of chronic pulmonary hypertension // *Physiol. Rev.* — 2000. — Vol. 80. — P. 1337–1372.
47. Hellwig-Burgel T., Stiehl D.P., Wagner A.E., Metzen E., Jelkmann W. Review: hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1): a novel transcription factor in immune reactions // *J. Interferon Cytokine Res.* — 2005. — Vol. 25. — P. 297–310.
48. Heyman S.N., Goldfarb M., Darmon D., Brezis M. Tissue oxygenation modifies nitric oxide bioavailability // *Microcirculation.* — 1999. — Vol. 6. — P. 199–203.
49. Huang Z., Louderback J.G., Goyal M., Azizi F., King S.B., Kim-Shapiro D.B. Nitric oxide binding to oxygenated hemoglobin under physiologic conditions // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2001. — Vol. 1568. — P. 252–260.
50. Ignarro L.J., Lippton H., Edwards J.C., Baricos W.H., Hyman A.L., Kadowitz P.J., Gruetter C.A. Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* — 1981. — Vol. 218. — P. 739–749.
51. Joshi M.S., Ferguson T.B. Jr., Han T.H., Hyde D.R., Liao J.C., Rassaf T., Bryan N., Feilisch M., Lancaster J.R. Jr. Nitric oxide is consumed, rather than conserved, by reaction with oxyhemoglobin under physiological conditions // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2002. — Vol. 99. — P. 10341–10346.
52. Kabakov A.E., Budagova K.R., Bryantsev A.L., Latchman D.S. Heat shock protein 70 or heat shock protein 27 overexpressed in human endothelial cells during posthypoxic reoxygenation can protect from delayed apoptosis // *Cell Stress Chaperones.* — 2003. — Vol. 8. — P. 335–347.
53. Kacimi R., Chentoufi J., Honbo N., Long C.S., Karliner J.S. Hypoxia differentially regulates stress proteins in cultured cardiomyocytes: role of the p38 stress-activated kinase signaling cascade, and relation to cytoprotection // *Cardiovasc. Res.* — 2000. — Vol. 46. — P. 139–150.
54. Kagota S., Tada Y., Kubota Y. et al. Peroxynitrite is involved in the dysfunction of vasorelaxation in SHR/NDmcr-cp rats, spontaneously hypertensive obese rats // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* — 2007. — Vol. 50. — P. 677–685.
55. Kakuyama M., Vallance P., Ahluwalia A. Endothelium-dependent sensory NANC vasodilatation: involvement of ATP, CGRP and a possible NO store // *Brit. J. Pharmacol.* — 1998. — Vol. 123. — P. 310–316.
56. Kim-Shapiro D.B., Schechter A.N., Gladwin M.T. Unraveling the reactions of nitric oxide, nitrite, and hemoglobin in physiology and therapeutics // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 2006. — Vol. 26. — P. 697–705.
57. Kleinbongard P., Keymel S., Kelm M. New functional aspects of the L-arginine-nitric oxide metabolism within the circulating blood // *Thromb. Haemost.* — 2007. — Vol. 98. — P. 970–974.
58. Kleschyov A.L., Muller B., Keravis T., Stoeckel M.-E., Stoclet J.-C. Adventitia-derived nitric oxide in rat aortas exposed to endotoxin: cell origin and functional consequences // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* — 2000. — Vol. 279. — H2743–H2751.
59. Kolar F., Jezkova J., Balkova P., Breh J., Neckar J., Novak F., Novakova O., Tomasova H., Srbova M., Ost'adal B., Wilhelm J., Herget J. Role of oxidative stress in PKC-delta upregulation and cardioprotection induced by chronic intermittent hypoxia // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* — 2007. — Vol. 292. — H224–H230.
60. Kubrina L.N., Mikoyan V.D., Mordvintcev P.I., Vanin A.F. Iron potentiates bacterial lipopolysaccharide-induced nitric oxide formation in animal organs // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1993. — Vol. 1176. — P. 240–244.
61. Kurozumi R., Takahashi M., Kojima S. Increase of intracellular glutathione by low-level NO mediated by transcription factor NF-kappaB in RAW 264.7 cells // *Biol. Pharm. Bull.* — 2005. — Vol. 28. — P. 779–785.
62. Lakomkin V.L., Vanin A.F., Timoshin A.A., Kapelko V.I., Chazov E.I. Long-lasting hypotensive action of stable preparations of

- dinitrosyl-iron complexes with thiol-containing ligands in conscious normotensive and hypertensive rats // *Nitric Oxide*. — 2007. — Vol. 16. — P. 413–418.
63. Lancaster J.R. Stimulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1994. — Vol. 91. — P. 8137–8141.
64. Lauer T., Preik M., Rassaf T., Strauer B.E., Deussen A., Feilisch M., Kelm M. Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2001. — Vol. 98. — P. 12814–12819.
65. Le Cras T.D., McMurtry I.F. Nitric oxide production in the hypoxic lung // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* — 2001. — Vol. 280. — P. L575–L582.
66. Liao J.C., Hein ..., Vaughn M.W., Huang K.T., Kuo L. Intra-vascular flow decreases erythrocyte consumption of nitric oxide // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1999. — Vol. 96. — P. 8757–8761.
67. Lipinski P., Drapier J.C. Interplay between ferritin metabolism, reactive oxygen species and nitric oxide // *J. Biol. Inorg. Chem.* — 1997. — Vol. 2. — P. 559–566.
68. Lipinski P., Starzynski R.R., Drapier J.C., Bouton C., Bartlomieczyk T., Sochanowicz B., Smuda E., Gajkowska A., Kruszewski M. Induction of iron regulatory protein 1 RNA-binding activity by nitric oxide is associated with a concomitant increase in the labile iron pool: implications for DNA damage // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2005. — Vol. 327. — P. 349–355.
69. Liu X., Miller M.J.S., Joshi M.S., Sadowska-Krowicka H., Clark D.A., Lancaster J.R. Jr. Diffusion-limited reaction of free nitric oxide with erythrocytes // *J. Biol. Chem.* — 1998. — Vol. 273. — P. 18709–18713.
70. Liu Z., Nakatsu K., Brien J.F., Beaton E.D., Marks G.S., Maurice D. Selective sequestration of nitric oxide by subcellular components of vascular smooth muscle and platelets: relationship to nitric oxide stimulation of the soluble guanylyl cyclase // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* — 1993. — Vol. 71. — P. 938–945.
71. Luchsinger B.P., Rich E.N., Gow A.J., Williams E.M., Stamler J.S., Singel D.J. Routes to S-nitroso-hemoglobin formation with heme redox and preferential reactivity in the B subunits // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2003. — Vol. 100. — P. 461–466.
72. Lundberg J.O., Weitzberg E., Lundberg J.M., Alving K. Intra-gastric nitric oxide production in humans: measurements in expelled air // *Gut*. — 1994. — Vol. 35. — P. 1543–1546.
73. Lundberg J.O., Weitzberg E. NO generation from nitrite and its role in vascular control // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 2005. — Vol. 25. — P. 915–922.
74. Maher A.R., Milsom A.B., Gunaruwan P., Abozguia K., Ahmed I., Weaver R.A., Thomas P., Ashrafian H., Born G.V., James P.E., Frenneaux M.P. Hypoxic modulation of exogenous nitrite-induced vasodilation in humans // *Circulation*. — 2008. — Vol. 117. — P. 670–677.
75. 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.
76. Manukhina E.B., Caffrey J.L., Barlow M., Vanin A.F., Mikoyan V.D., Downey H.F. Nitric oxide stores in coronary blood vessels of dogs with metabolic syndrome // *FASEB J.* — 2009. — 23. — P. 628.8.
77. 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.
78. 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.
79. Manukhina E.B., Malyshev I.Yu. Role of free NO and NO stores in protective effects of adaptation to hypoxia // Singal P.K., Takeida N., eds. *Adaptation Biology and Medicine Vol. 4: Current Concepts*. — New Delhi: Narosa; 2005. — P. 82–94.
80. Manukhina E.B., Mashina S.Yu., Smirin B.V., Lyamina N.P., Senchikhin V.N., Vanin A.F., Malyshev I.Y. Role of nitric oxide in adaptation to hypoxia and adaptive defense // *Physiol. Res.* — 2000. — Vol. 49. — P. 89–97.
81. Manukhina E.B., Smirin B.V., Pshennikova M.G., Vanin A.F., Markov H.M., Malyshev I.Yu. Production and storage of nitric oxide in adaptation to hypoxia: genetic peculiarities // *Hypoxia Med. J.* — 2002. — Vol. 4. — P. 35–40.
82. Megson I.L., Flitney F.W., Bates J., Webster R. Repriming of vascular smooth muscle photorelaxation is dependent upon endothelium-derived nitric oxide // *Endothelium*. — 1995. — Vol. 3. — P. 39–46.
83. Megson I.L., Holme S.A., Magid K.S. Selective modifiers of glutathione biosynthesis and 'repriming' of vascular smooth muscle photorelaxation // *Br. J. Pharmacol.* — 2000. — Vol. 130. — P. 1575–1580.
84. Melillo G., Musso T., Sica A., Taylor L.S., Cox G.W., Varesio L. A hypoxia responsive element mediates a novel pathway of activation of the inducible nitric oxide synthase promoter // *J. Exp. Med.* — 1995. — Vol. 182. — P. 1683–1693.
85. Millar T.M., Stevens C.R., Benjamin N., Eisenthal R., Harrison R., Blake D.R. Xanthine oxidoreductase catalyses the reduction of nitrates and nitrite to nitric oxide under hypoxic conditions // *FEBS Lett.* — 1998. — Vol. 427. — P. 225–228.
86. Moncada S., Higgs E.A. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology // *Br. J. Pharmacol.* — 2006. — Vol. 147. — P. S193–201.
87. Muller B., Kleschyov A.L., Gyorgy K., Stoclet J.C. Inducible NO synthase activity in blood vessels and heart: new insight into cell origin and consequences // *Physiol. Res.* — 2000. — Vol. 49. — P. 19–26.
88. Muller B., Kleschyov A.L., Malblanc S., Stoclet J.C. Formation of nitric oxide stores in vascular tissue // *Fund. Clin. Pharmacol.* — 1998. — Vol. 12. — P. 351.
89. Muller B., Kleschyov A.L., Stoclet J.C. Evidence for N-acetylcysteine-sensitive nitric oxide storage as dinitrosyl iron complexes in lipopolysaccharide-treated rat aorta // *Brit. J. Pharmacol.* — 1996. — Vol. 119. — P. 1281–1285.
90. Patel A., van de Poll M.C., Greve J.W., Buurman W.A., Fearon K.C., McNally S.J., Harrison E.M., Ross J.A., Garden O.J., Dejong C.H., Wigmore S.J. Early stress protein gene expression in a human model of ischemic preconditioning // *Transplantation*. — 2004. — Vol. 78. — P. 1479–1487.
91. Effect of a prolonged superoxide flux on transferrin and ferritin // *Arch. Biochem. Biophys.* — 2000. — Vol. 382. — P. 253–261.
92. Pluta R.M., Dejam A., Grimes G., Gladwin M.T., Oldfield E.H. Nitrite infusions to prevent delayed cerebral vasospasm in a primate model of subarachnoid hemorrhage // *J. Am. Med. Assoc.* — 2005. — Vol. 293. — P. 1477–1484.
93. Ramachandran A., Ceaser E., Darley-Usmar V.M. Chronic exposure to nitric oxide alters the free iron pool in endothelial cells: role of mitochondrial respiratory complexes and heat shock proteins // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2004. — Vol. 101. — P. 384–389.
94. Rassaf T., Kelm M. Nitrite and nitrospecies in blood and tissue: approaching the gap between bench and bedside // van Faassen E., Vanin A.F., eds. *Radicals for Life: The Various Forms of Nitric Oxide*. — Amsterdam: Elsevier; 2007. — P. 269–288.
95. Ridnour L.A., Sim J.E., Choi J., Dickinson D.A., Forman H.J., Ahmad I.M., Coleman M.C., Hunt C.R., Goswami P.C., Spitz D.R. Nitric oxide-induced resistance to hydrogen peroxide stress is a glutamate cysteine ligase activity-dependent process // *Free Radic. Biol. Med.* — 2005. — Vol. 38. — P. 1361–1371.
96. Rodriguez F.A., Ventura J.L., Casas M., Casas H., Pages T., Rama R., Ricart A., Palacios L., Viscor G. Erythropoietin acute reaction and haematological adaptations to short, intermittent hypobaric hypoxia // *Eur. J. Appl. Physiol.* — 2000. — Vol. 82. — P. 170–177.
97. Ryou M.-G., Sun J., Oguayo K.N., Manukhina E.B., Downey H.F., Mallet R.T. Hypoxic conditioning suppresses nitric oxide production upon myocardial reperfusion // *Exp. Biol. Med.* — 2008. — Vol. 233 (6). — P. 766–774.
98. Sarr M., Lobysheva I., Diallo A.S., Stoclet J.C., Schini-Kerth V.B., Muller B. Formation of releasable NO stores by S-nitrosoglutathione in arteries exhibiting tolerance to glyceryl-trinitrate // *Eur. J. Pharmacol.* — 2005. — Vol. 513. — P. 119–123.
99. Sato I., Murota S. Paracrine function of endothelium-derived nitric oxide // *Life Sci.* — 1995. — Vol. 13. — P. 1079–1087.
100. Semenza G.L. O<sub>2</sub>-regulated gene expression: transcriptional control of cardiorespiratory physiology by HIF-1 // *J. Appl. Physiol.* — 2004. — Vol. 96. — P. 1173–1177.
101. Simpson R.J. Effect of hypoxia on iron absorption in heterozygous hypotransferrinaemic mice // *Ann. Hematol.* — 1992. — Vol. 65. — P. 260–264.
102. Sokolowska M., Wlodek L., Srebro Z., Wrobel M. The effect of nitrogen oxide level modulation on the content of thiol compounds



and anaerobic sulfur metabolism in mice brains // *Neurobiology*. — 1999. — Vol. 7. — P. 461–477.

103. Stampler J.S., Jia L., Eu J.P., McMahon T.J., Demchenko I.T., Bonaventura J., Gernert K., Piantadosi C.A. Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient // *Science*. — 1997. — Vol. 276. — P. 2034–2037.

104. Stoclet J.C., Muller B., Gyorgy K., Andriantsiohaina R., Kleschyov A.L. The inducible nitric oxide synthase in vascular and cardiac tissue // *Eur. J. Pharmacol.* — 1999. — Vol. 375. — P. 139–155.

105. Terluk M.R., da Silva-Santos J.E., Assreuy J. Involvement of soluble guanylate cyclase and calcium-activated potassium channels in the long-lasting hyporesponsiveness to phenylephrine induced by nitric oxide in rat aorta // *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* — 2000. — Vol. 361. — P. 477–483.

106. 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.

107. Troncy E., Francoeur M., Salazkin I., Yang F., Charbonneau M., Leclerc G., Vinay P., Blaise G. Extra-pulmonary effects of inhaled nitric oxide in swine with and without phenylephrine // *Br. J. Anaesth.* — 1997. — Vol. 79. — P. 631–640.

108. Tsuchiya K., Kanematsu Y., Yoshizumi M., Ohnishi H., Kirima K., Izawa Y., Shikishima M., Ishida T., Kondo S., Kagami S., Takiguchi Y., Tamaki T. Nitrite is an alternative source of NO in vivo // *Am. J. Physiol. Heart Circ Physiol* 2005. — Vol. 288. — H2163–H2170.

109. van Faassen E., Vanin A.F., Slama-Schwok A. Nitrite as endothelial NO donor in cells and tissues // E. van Faassen, A.F. Vanin, eds. *Radicals for Life: The Various Forms of Nitric Oxide*. — Amsterdam: Elsevier; 2007. — P. 291–312.

110. 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. — C1131–C1150.

111. Vanin A.F. Dinitrosyl iron complexes with thiolate ligands: physico-chemistry, biochemistry and physiology // *Nitric Oxide*. — 2009. — Apr. 11. [Epub ahead of print].

112. Vanin A.F., Bevers L.M., Slama-Schwok A., van Faassen E.E. Nitric oxide synthase reduces nitrite to NO under anoxia // *Cell Mol. Life Sci.* — 2007. — Vol. 64. — P. 96–103.

113. Vanin A.F., Kleschyov A.L. EPR detection and biological implication of nitrosyl non-heme iron complexes // Lukiewicz S.J.,

Zweier J.L., eds. *Nitric oxide in transplant rejection and anti-tumor defense*. — Norwell, MA: Kluwer; 1998. — P. 49–82.

114. Vanin A.F., Manukhina E.B. Hypotensive, vasodilatory and anti-aggregative properties of dinitrosyl-iron complexes // van Faassen E., Vanin A.F., eds. *Radicals for life: the various forms of nitric oxide*. — Amsterdam: Elsevier, 2007. — P. 75–96.

115. Vanin A.F., Mordvintcev P.I., Kleschyov A.L. Role of nitric oxide and iron in hypotensive action of nitrosyl iron complexes with various anion ligands // *Stud. Biophys.* — 1985. — Vol. 105. — P. 93–102.

116. Vanin A.F., Sanina N.A., Serezhenkov V.A., Burbaev D.Sh., Losinsky V.I., Aldoshin S.M. Dinitrosyl-iron complexes with thiol-containing ligands: Spatial and electronic structures // *Nitric Oxide Biol. Chem.* — 2007. — Vol. 16. — P. 82–93.

117. Vanin A.F., van Faassen E. Chemical equilibria between S-nitrosothiols and dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands // van Faassen E., Vanin A.F., eds. *Radicals for life: the various forms of nitric oxide*. — Amsterdam: Elsevier; 2007. — P. 223–252.

118. Vanin A.F., van Faassen E. DNICs: physico-chemical properties and their observations in cells and tissues // van Faassen E., Vanin A.F., eds. *Radicals for life: the various forms of nitric oxide*. — Amsterdam: Elsevier; 2007. — P. 19–73.

119. Vaughn M.W., Huang K.T., Kuo L., Liao J.C. Erythrocytes possess an intrinsic barrier to nitric oxide consumption // *J. Biol. Chem.* — 2000. — Vol. 275. — P. 2342–2348.

120. Venturini C.M., Palmer R.M., Moncada S. Vascular smooth muscle contains a depletable store of a vasodilator which is light-activated and restored by donors of nitric oxide // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* — 1993. — Vol. 266. — P. 1497–1500.

121. Wong H.R., Finder J.D., Wasserloos K., Pitt B.R. Expression of inducible nitric oxide synthase in cultured rat pulmonary artery smooth muscle cells is inhibited by the heat shock response // *Am. J. Physiol. Lung Cell Molec. Physiol.* — 1995. — Vol. 269. — L843–L848.

122. Wu C.C., Yen M.H. Nitric oxide synthase in spontaneously hypertensive rats // *Biomed. Sci.* — 1997. — Vol. 4. — P. 249–255.

123. Yang Y., Loscalzo J. S-Nitrosated proteins: formation, metabolism and function // van Faassen E., Vanin A.F., eds. *Radicals for life: the various forms of nitric oxide*. — Amsterdam: Elsevier; 2007. — P. 201–221.

## ***Nitric oxide (NO) stores and their adaptive function in the cardiovascular system***

**Manukhina E.B., Downey H.F., Mallet R.T., Malyshev I.Yu., Vanin A.F.**

*Nitric oxide (NO) is a highly reactive substance with short lifetime. Under the conditions of a living body NO can be bound into complexes used for transport and intracellular storage of NO. The major biological forms of NO stores include S-nitrosothiols and dinitrosyl iron complexes capable of interconversion. Recent observations in animals and humans have greatly increased interest in possible functions of nitrite, especially with respect of its conversion to NO under conditions of hypoxia. The NO store formed by these compounds, on the one hand, provides for protection from excessive free NO after its overproduction and, on the other hand, can be an additional NO source when it is deficient. Adaptation of animals to intermittent hypoxia is associated with formation of NO stores. Intermittent hypoxia may confer protection of the cardiovascular system in the setting of both NO deficiency and NO overproduction. On one hand, binding of excessive NO to NO stores protects tissues from NO toxicity and from the hypotension associated with excessive NO. On the other hand, NO stores can serve as a reserve of NO when NO production is depressed. Thus, formation and degradation of NO stores can play an important role in prevention of cardiovascular disorders associated with either excess or deficiency of NO, and modulation of NO storage can be clinically important.*

**Key words:** nitric oxide, nitric oxide stores, blood vessels, NO donors, nitrosothiols, dinitrosyl iron complex, adaptation, hypoxia, hypertension, Alzheimer's disease