

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ
УЗБЕКИСТАН
ТАШКЕНТСКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ**

Кульманова М.У., Касимова Г.З., Сабирова Р.А.

**ОКСИД АЗОТА И ЕГО РОЛЬ В РАЗВИТИИ
ПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ**

Ташкент - 2014

- Кульманова М.У. – кандидат медицинских наук, заведующая кафедрой биоорганической и биологической химии Ташкентской медицинской академии
- Касимова Г.З. - ассистент кафедры биоорганической и биологической химии Андижанского Государственного медицинского института
- Сабирова Р.А. - доктор медицинских наук, профессор кафедры биоорганической и биологической химии Ташкентской медицинской академии

Рецензенты:

- Данияров А.Н. – доктор медицинских наук, профессор кафедры нормальной физиологии, информатики и биофизики Ташкентской медицинской академии
- Юлдашев Н.М. - доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой биоорганической и биологической химии Ташкентского медицинского педиатрического института

Аннотация

на монографию М.У.Кульмановой, Г.З.Касимовой, Р.А.Сабировой, выполненной на тему: «*Оксид азота и его роль в развитии патологических состояний*»

Ключевые слова: оксид азота, NO-система, индуцибельная NOS, эндотелиальная NOS, сальмонеллезная инфекция, хронический гепатит, метаболический синдром, гиперхолестеринемия, гастродуоденальная язва, ваготомия.

Объекты исследования: экспериментальные крысы и кролики.

Цель работы: распространение знаний о роли оксида азота в развитии острой сальмонеллезной инфекции, хронического гепатита, микст-патологий, метаболического синдрома, гиперхолестеринемии, гастродуоденальной язвы; роли L-аргинина и его аналогов, а также препаратов, ингибирующих активность синтазы оксида азота в корригирующей терапии.

Методы исследования: биохимические, статистические.

Полученные данные и их новизна: Фундаментальными исследованиями раскрыта новая концепция научного направления: в основе развития неспецифических и специфических патологических состояний организма при действии факторов среды лежат, выработанные в процессе эволюции на молекулярно-генетическом, системном, организменном уровне компенсаторно-приспособительная и адаптационная перестройка NO-системы.

Практическое значение: Расширяет знания о роли системы оксида азота в развитии различных патологических состояний и способствует выработке патогенетически обоснованных методов лечения.

Связь монографии тематическим планом НИР: Монография выполнена в соответствии планами научно-исследовательских работ ТМА, гранта Ф6-С-С-0-61467. Ф6-СС-О-61467 (ФДСС 12-14).

Структура и объем монографии: монография изложена на 169 страницах компьютерного текста (шрифт 14 А, 1,5 интервал), содержит 13 разделов, заключение, выводы, иллюстрирована 10 рисунками и 6 таблицами. Список литературы содержит 210 источников.

Оглавление

	стр.
Предисловие	9
Историческая справка	10
Химические свойства азота и его соединений	15
Источники оксида азота в биологических системах	17
Синтез оксида азота в организме	19
Пути метаболизма NO в организме	35
Патобиохимия системы оксида азота	36
Свойства пероксинитрита (ONOO^-) и радикала диоксида азота ($\cdot\text{NO}_2$)	46
Физиологические свойства оксида азота в биологии и клинике	58
Связь эндотелиальной функции и оксида азота	99
Роль оксида азота в развитии сальмонеллезной инфекции на фоне хронического гелиотринового гепатита	103
Состояние NO-системы в микросомах желудка при язвенном поражении, резекции и ваготомии	123
Роль оксида азота в развитии метаболического синдрома	129
Динамика изменения содержания оксида азота при экспериментальной гиперхолестеринемии	135
Заключение	143
Библиографический указатель	149

Список условных сокращений

АКМ	– активные кислородные молекулы
АФК	– активные формы кислорода
АХ	– ацетилхолин
БФБ	– 4-метилбромфенацилбромид
ГМК	– гладкомышечная клетка
ИБС	– ишемическая болезнь сердца
ИЛ	– интерлейкин
ИФ	– интерферон
КР	– креатинин
ЛПВП	– липопротеиды высокой плотности
ЛПНП	– липопротеиды низкой плотности
МДА	– малоновый диальдегид
НАДФН	– никотинамиддинуклеотидфосфат
нмDNIC	– низкомолекулярные DNIC
нмRSNO	– низкомолекулярные нитрозотиолы
ПМ	– плазматическая мембрана
ПОЛ	– перекисное окисление липидов
рГЦ	– растворимая гуанилатциклаза
РФК	– реактивные формы кислорода
СБАС	– семейный боковой амиотрофический склероз
СО	– слизистая оболочка
СОЖ	– слизистая оболочка желудка
СОД (SOD)	– супероксиддисмутаза
СРК	– свободные радикалы кислорода
СФЖ	– свободный фонд железа
ФАД (FAD)	– флавинадениндинукдеотид
ФАТ	– фактор активации тромбоцитов

ФЛА – фосфолипаза А

ФМН (FMN) – флавинмоноклеотид

ХГ – хронический гепатит

ЦНС – центральная нервная система

ЭК – эндотелиальные клетки

ЭПР – электронный парамагнитный резонанс

ЭР – эндоплазматический ретикулум

ЭФР – эндотелиальный фактор релаксации сосудов

ЯБЖ – язвенная болезнь желудка

ЯП – язвенное поражение

ADP – аденозиндифосфат

Araf-1 – активирующий протеазы фактор

АТР – аденозинтрифосфат

cAMP – циклический аденозинмонофосфат

cGMP – циклический гуанидинмонофосфат

CO_3^- – карбонатный анион

DISC – сигнальный комплекс

EDRF – эндотелийрелаксирующий фактор

eNOS (NOS-3) – эндотелиальная NO-синтаза

GSNO – S-нитрозоглутатион

GS(O)SG – глутатиондисульфид-S-оксид

GSSG (GSH) – глутатион

Hb – гемоглобин

HbSNO – S-нитрозогемоглобин

HcySNO – S-нитрозогомоцистеин

HIF-1 – транскрипционный фактор-1

HOCl – гипохлорная кислота

Hsp 70 – белок теплового шока

IL – интерлейкин

iNOS (NOS-2) – индуцибельная NO-синтаза
IRP – железорегулирующий белок
L-NAME – N-нитро-L-аргининметилловый эфир
L-NMMA – N-монометил-L-аргинин
L-NNA – N-нитро-L-аргинин
NF-κB – противовоспалительный ядерный фактор
NMDA – N-метил-D-аспартат
nNOS (NOS-1) – нейрональная NO-синтаза
NO – оксид азота
NO• – оксид азотного радикала
•NO₂ – радикал диоксида азота
N₂O₃ – диазоттриоксид
NO⁺ – катионы нитрозония
NO⁻ – анион нитроксила
NOS – NO-синтаза
O₂ – молекулярный кислород
O₂⁻ – супероксиданион
O₃ – озон
OH⁻ – гидроксил-радикал
ONOO⁻ – пероксинитрит
ONOO⁻COO⁻ – нитрозопероксикарбонатный анион
PKC – протеинкиназа C
PKG – протеинкиназа
PLTP – белок, переносящий плазменные фосфолипиды
RNOS – реактивные формы оксида азота
ROS – реактивные формы кислорода
TNF-α (ФНО-α) – опухолевый некротический фактор

Предисловие

В последние годы исследования в биологической химии и клинической медицине все чаще проводятся на клеточно-мембранном и молекулярном уровнях. Всё большее число работ посвящено патохимическим изменениям при различных заболеваниях, в том числе изменениям сосудистой стенки [29, 136, 158]. Такие исследования существенно расширили классическое представление о сосудистом эндотелии как об анатомическом барьере, препятствующем проникновению крови в стенку сосудов. Стало очевидным, что эндотелий сосудов – это активная метаболическая система, поддерживающая сосудистый гомеостаз, выполняя ряд важнейших функций: модулирование тонуса сосудов; регуляция транспорта растворенных веществ в клетки сосудистой стенки, роста этих клеток; формирование внеклеточного матрикса; защита сосудов от возможного неблагоприятного действия циркулирующих клеток и субстанций; регуляция хемотоксических, воспалительных и репаративных процессов в ответ на локальное повреждение [10, 53, 101, 127]. Эти функции эндотелий сосудов осуществляет синтезируя и выделяя различные биологически активные соединения. Среди них наиболее значимы оксид азота (NO), простациклин и эндотелин-1. Первые два – наиболее мощные из известных вазодилататоров, а эндотелин оказывает не менее сильное, но противоположное действие на тонус сосудов и другие функции. Различного рода биорегуляторные влияния NO во многом повторяют ранее описанные влияния простациклина на структуру и функции сосудов, а также клеток крови. Эти два соединения дополняют, а в некоторых случаях и дублируют друг друга. Но NO обладает и самостоятельными свойствами, важными для физиологии и патофизиологии различных систем, жизнеспособности организма в целом. Широким спектром этих эффектов и их значимостью объясняется большой интерес к данной молекуле в различных областях биологии и медицины в последние 10-15 лет. В частности, и к механизмам

развития дисфункции эндотелия – ведущего патогенетического фактора многих заболеваний сердца и сосудов.

Историческая справка

Громадный интерес к биологии оксида азота позволил журналу «Science» еще в 1992 г. провозгласить его молекулой года. В последующие годы было установлено, что в организме животных и человека оксид азота непрерывно продуцируется ферментативным путем из аминокислоты аргинина и является одним из универсальных регуляторов метаболизма. Он вызывает расслабление гладкой мускулатуры стенок кровеносных сосудов, подавляет агрегацию тромбоцитов и их адгезию, нормализует работу центральной, периферической и вегетативной нервной систем, регулирует деятельность органов дыхания, желудочно-кишечного тракта и мочеполовой системы. Кроме этого NO проявляет и цитотоксическую (цитостатическую) активность как один из основных компонентов клеточного иммунитета. Образование этого агента иммунокомпетентными клетками обеспечивает защиту организма от бактериальных и злокачественных клеток. Весьма интересны данные об участии NO и в процессе апоптоза – запрограммированной смерти клеток [15, 21, 122].

Нобелевская премия по физиологии и медицине в 1998 г. была присуждена трем американским исследователям: Фериду Мьюрэду (Техасский университет в Хьюстоне), Роберту Фёрчготту (Университет штата Нью-Йорк) и Луису Игнарро (Калифорнийский университет в Лос-Анджелесе) за установление функциональной роли оксида азота в работе сердечно-сосудистой системы. Тем самым была подведена первая черта под лавинообразным потоком публикаций, посвященных изучению функциональных свойств этого простейшего химического соединения.

Роберт Фёрчготт (Robert Furchgott) родился 4 июня 1916 г. в г. Чарлстоне (штат Южная Каролина, США). В 1937 г. закончил Университет

штата Северная Каролина как химик и через три года получил докторскую степень по биохимии в Северо-Западном университете (США). В 1956 - 1988 гг. он - профессор отделения фармакологии Университета штата Нью-Йорк, с 1988 г. – адъюнкт-профессор отделения фармакологии Университета Майами. В настоящее время – почетный профессор отделения фармакологии Центра науки о здоровье Университета штата Нью-Йорк.

Заслуга Р.Фёрчготта состоит в том, что в 1980 г. он открыл так называемый эндотелиальный фактор релаксации сосудов (ЭФР). Этот короткоживущий фактор выделяется из эндотелия изолированных кровеносных сосудов в ответ на введение в инкубационную среду биологически активных веществ и вызывает расслабление гладкой мускулатуры сосудов.

В 1986 г. Л.Игнарро и Р.Фёрчготт по результатам анализа способности ЭФР и NO расслаблять сосуды, а также факторов, влияющих на эту способность, предположили, что активным началом ЭФР служит оксид азота.

Химико-физиологические исследования, выполненные группой испанского ученого Сальвадора Монкада в 1987 г. полностью подтвердили это предположение. Открытие эндотелиального фактора релаксации сосудов резко подняло интерес к биологической роли оксида азота и стимулировало поток исследований в этой области.

Ферид Мьюрэд (Ferid Murad) родился 14 сентября 1936 г. в штате Индиана (США). Окончил Университет в г. Кливленде (штат Огайо), там же (1965 г.) получил степень доктора фармакологии. В 1971-1981 гг. возглавлял клинический исследовательский центр Университета штата Вирджиния, занимал должность профессора в нескольких американских университетах. В настоящее время – профессор отделения биологии, фармакологии и физиологии Техасского университета в Хьюстоне.

В середине 70-х годов Мьюрэд и его сотрудники установили, что оксид азота активизирует работу важнейшего внутриклеточного фермента –

гуанилатциклазы, которая обеспечивает синтез одного из вторичных мессенджеров – циклического гуанозинмонофосфата. Таким образом, впервые стало ясно, что NO, известный лишь как токсическое соединение, обладает еще и положительным биологическим действием.

Луис Игнарро (Louis Ignarro) родился 31 мая 1941 г. в Бруклине (Нью-Йорк, США). В 1962 г. окончил Колумбийский университет, а в 1966 г. в Университете штата Миннесота получил докторскую степень по фармакологии. В 1979-1985 гг. – профессор отделения фармакологии Университета в Новом Орлеане, затем – профессор Университета в Лос-Анджелесе (Калифорния). В настоящее время – профессор отделения молекулярной и медицинской фармакологии Медицинской школы того же университета.

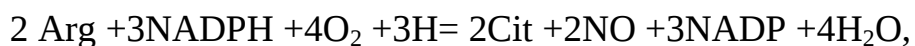
В конце 70-х начале 80-х годов группы Л.Игнарро и Ф.Мьюрэда выяснили, что расслабляющее действие оксида азота на кровеносные сосуды и его способность тормозить агрегацию тромбоцитов связаны именно с активацией гуанилатциклазы. Это позволило понять механизмы гипотензивного, спазмолитического, а также противотромбозного действия различных нитрозо- и нитросоединений (в частности нитроглицерина), способных продуцировать в организме животных и человека оксид азота.

В начале 80-х годов XX в. Группа Танненбаума (США) установила, что нитриты и нитраты синтезируются в организме животных и человека из эндогенных источников и этот процесс резко усиливается при воспалении. При окислении восстановленных форм азота в качестве промежуточного продукта может возникать оксид азота.

В середине этого же десятилетия две группы американских исследователей (Марлетт и Гиббс с сотрудниками), независимо друг от друга, обнаружили, что активированные макрофаги продуцируют оксид азота, причем эффективность его образования соответствовала уровню цитотоксического и цитостатического действия этих клеток. Выяснилось, что NO сам по себе полностью имитирует действие активированных макрофагов

на клетки-мишени. Именно Гиббс впервые продемонстрировал, что NO образуется в результате окисления аминокислоты в гуанидиновом остатке аргинина. Эта идентификация позволила использовать производные аргинина с заместителем по аминокислоте этого остатка в качестве ингибиторов ферментативного синтеза NO.

Марлетт описал схему реакций, приводящих к образованию NO из аргинина, превращающегося при этом в другую аминокислоту – цитрулин, которая затем вновь рециклируется, пополняя внутриклеточные запасы аргинина. Схематически реакцию синтеза NO можно привести в виде уравнения:



где Arg – аргинин, Cit – цитрулин

Стало ясно, что образование NO в биосистемах – ферментативный процесс, который может подавляться различными производными аргинина. Использование специфических ингибиторов синтеза NO существенно облегчило поиск биосистем, способных продуцировать этот агент.

В конце 80-х годов Гэртвэйт и его сотрудники (Великобритания), изучая ЭФР-подобную активность срезов ткани мозга, подтвердили, что она подавляется такими производными аргинина. Вследствие этого возник вопрос об участии эндогенно продуцируемого NO в работе центральной и вегетативной нервной систем.

Интересно, что в 1965-1968 гг. А.Ф. Ванин в России, Коммонер и Бреннан в США параллельно показали, что в микроорганизмах и тканях животных образуются парамагнитные нитрозильные комплексы негемового и гемового железа, включающие оксид азота, т.е. было продемонстрировано появление в организме животных NO. Этот результат был получен с помощью метода электронного парамагнитного резонанса (ЭПР), открытого в России в 1944 г. Однако исследователи решили, что оксид азота, входящий в эти комплексы, образуется из экзогенных источников – нитритов,

попадающих в организм с диетой или в результате жизнедеятельности микрофлоры кишечника.

В 1984 г. был разработан метод прямого определения NO в организме животных с помощью избирательной ловушки комплексов двухвалентного железа с производными дитиокарбамата. Образующие при этом соответствующие парамагнитные комплексы регистрируются спектроскопией ЭПР. Этот метод позволил А.Ф. Ванину продемонстрировать (1987 г.) технологию образования в организме животных оксида азота из эндогенных источников. Сегодня этот метод широко используется во всем мире и, кроме того, на его основе была разработана методика томографической оценки распределения оксида азота в тканях животных *in vivo* и *in vitro* (Звайер – США, Йосимура – Япония).

В 90-е годы стало ясно, что все направления исследований сводятся к одной проблеме – изучению биологической роли NO. Такое объединение – свидетельство универсального значения этого агента для биологических систем. Заслуга нобелевских лауреатов Ф.Мьюрэда, Р.Фёрчготта и Л.Игнаро состоит в том, что их основополагающие исследования позволили определить общую проблему и, соответственно, новую область – биология оксида азота.

В настоящее время в этой области работают сотни исследователей. Число публикаций достигает нескольких тысяч в год. Поскольку оксид азота имеет отношение почти ко всем метаболическим и физиологическим процессам, есть все основания полагать, что эти работы помогут решить не только фундаментальные биологические задачи, но и чисто прикладные, особенно медицинские. Особый интерес представляет способность оксида азота экспрессировать синтез ряда важнейших белков и ферментов как на уровне транскрипции, так и трансляции: стресс-белки, ферритин, белки антиоксидантной защиты, белки рецепторов трансферрина, ядерный белок p53, ответственный за блокаду злокачественных новообразований и др. Оксид азота может также влиять на активность многих белков и ферментов –

гуанилатциклазы, рибонуклеотидредуктазы, компонентов дыхательной цепи митохондрий и гликолиза, фактора транскрипции NF-kB, белков типа цитохрома P-450, белков ионных каналов и др. В этой связи чрезвычайно важно понять, в какой форме (связанной или свободной) оксид азота транспортируется в организме и в каком виде (нейтральном или ионизированном) он действует на биологические мишени. Решение этого вопроса необходимо для создания новых лекарств, способных имитировать биологическое действие NO.

Химические свойства азота и его соединений

Следует напомнить, что название «азот» происходит от греческого слова *azoos* – безжизненный, по-латыни *nitrogenium* (образующий селитру). Химический знак элемента – N. Азот – химический элемент V группы периодической системы Менделеева, порядковый номер 7, относительная атомная масса 14,0067; бесцветный газ, не имеющий запаха и вкуса.

Соединения азота, такие как селитра, азотная кислота, аммиак были известны задолго до получения азота в свободном состоянии. В 1772 г. Д. Резерфорд, сжигая фосфор и другие вещества в стеклянном колоколе, показал, что остающийся после сгорания газ, названный им «удушливым воздухом», не поддерживает дыхания и горения. В 1787 г. А. Лавуазье установил, что «жизненный» и «удушливый» газы, входящие в состав воздуха, это простые вещества, и предложил название «азот». Чуть ранее (1784 г.) Г. Кавендиш установил, что азот входит в состав селитры; отсюда и происходит латинское название азота (от позднелатинского *nitrum* – селитра и греческого *γενναο* – рождая, произвожу), предложенное в 1790 г. Ж. Шапталем. К началу XIX в. были выяснены химическая инертность азота в свободном состоянии и его исключительная роль в соединениях с другими элементами в качестве связанного азота.

Азот – это один из самых распространенных элементов на Земле, четвертый по распространенности элемент Солнечной системы после

водорода, гелия и кислорода. Основная его масса (около $4 \cdot 10^{15}$ тонн) сосредоточена в свободном состоянии в атмосфере.

Термином «оксид азота» (или «окись азота») обозначается восстановленная форма монооксида азота (NO) с периодом полураспада от 2 до 30 сек. Это растворимый в воде и жирах бесцветный газ с уникальными физиологическими свойствами. В химическом отношении NO представляет собой маленькую липофильную молекулу, состоящую из одного атома азота и одного атома кислорода и имеющую неспаренный электрон, что превращает ее в высокореактивный радикал, свободно проникающий через биологические мембраны и легко вступающий в реакции с другими соединениями. Маловыраженная поляризация молекулы NO – одна из причин плохой растворимости NO в воде. В химические реакции с водой NO не вступает и не является солеобразующим окислом. Кислород легко окисляет NO до солеобразующих окислов азота, в которых атомы азота имеют более высокие валентности и степень окисления. Гидратация солеобразующих окислов азота приводит к образованию азотистой (HNO_2) и азотной (HNO_3) кислот. Супероксиданион (O_2^-) окисляет NO до пероксинитрита (ONOO^-) [85, 91].

Возможность ионизации NO с образованием катиона нитрозония (NO^+) указывает на свойства NO как восстановителя, но спектр веществ, восстанавливаемых NO, невелик. К ним относятся молекулярный кислород (O_2), озон (O_3), супероксиданион (O_2^-), молекулярный фтор (F_2). Возможность ионизации NO с образованием аниона нитроксила (NO^-) указывает на свойства NO как окислителя в отношении биоорганических соединений.

Окись азота имеет две электронные структуры. Неспаренный электрон в них может находиться либо на атоме азота, либо - кислорода. Наличие этих электронов обеспечивает магнитный момент у молекулы, т.е. в магнитном поле она способна образовывать полимерную структуру с общей электронной оболочкой. Кроме того, при образовании спиральной структуры полимерная NO-молекула создает собственное магнитное поле

(направленное вдоль оси спирали), которое ориентирует отдельные молекулы NO и позволяет им встраиваться в полимерную цепочку. Прохождение тока по спирали расширяет ее диаметр. Общая электронная оболочка в полимерной NO-молекуле является проводником электрического тока [132].

Источники оксида азота в биологических системах

Оксид азота - универсальный регулятор метаболических процессов в разных клетках и тканях организма человека и животных.

Определенное его количество образуется во время экзогенного поступления органических нитрозосоединений как лекарственных средств (нитропруссид, нитроглицерин и др.). Кроме того, NO может образовываться из окисей азота, которые попадают в атмосферу из отопительных систем и в результате работы двигателей внутреннего сгорания, а затем – в организм ингаляционным путем [95].

NO вырабатывается различными типами клеток организма (эндотелиоцитами, эпителиоцитами, мезангиоцитами, миоцитами, лимфоцитами, нейтрофилами, тромбоцитами, макрофагами, фибробластами, нейронами, гепатоцитами, тучными и другими клетками) и контролирует в них многие биохимические процессы и функции [24].

Суточная продукция NO одним только эндотелием составляет 1,7 ммоль, а базальная концентрация газа в плазме приближается к 3 нмоль (уровень NO для клеток эндотелия оценивается в 4 пмоль/мин на 1 мг белка). Вследствие быстрого перехода в нитраты и нитриты свободный радикал NO имеет короткий период полужизни (5-30 секунд), что объясняет трудности его выявления в биологических жидкостях [13].

Среднее содержание нитритов/нитратов в крови у здоровых людей составляет около 10, а в моче – 50 мкмоль [7]. У детей нормальный уровень метаболитов NO в крови достигает ~ 25 (20-28) мкмоль. Необходимо отметить, что у новорожденных в дневные часы концентрация

нитритов/нитратов в моче составляет всего 2-3 нмоль/мл, а в ночное время - повышается до 14-16 нмоль/мл. Показатели нитритов/нитратов в моче здоровых людей равномерно распределяются в течение суток и не зависят от пола и возраста. Параметры с поправкой на экскрецию креатинина (кр) и выраженные в логарифмической шкале составляют для нитритов 17-22, а для нитратов – 1-3 пмоль/г/кр [21]. С возрастом в большинстве клеток организма синтез NO угнетается вследствие подавления активности оксидантной синтазы (NOS), и у лиц старше 75 лет NO-емия в 3-4 раза ниже, чем у 25-30-летних людей. Ослабление процессов синтеза NO - один из физиологических механизмов старения организма.

Крупнейшими источниками образования NO являются нитрит-редуктазные реакции, в частности, у бактериальной микрофлоры полости рта или желудочно-кишечного тракта. Важным источником окиси азота в организме являются клетки гранулоцитарного ряда. Учитывая хорошую растворимость окиси азота в липидной среде и слабую - в водной, можно предположить, что липидная компонента организма (в том числе ненасыщенные жирные кислоты), является своеобразным депо для этих молекул.

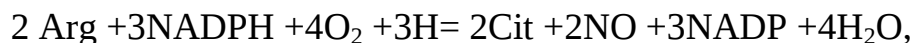
Под влиянием оксида азота окисляются тиолы с образованием нитрозотиолов. В плазме крови обнаруживаются нитрозотиолы цистеина, альбумина, а в клетках – нитрозотиолы глутатиона, цистеинилглицина, различных белков, включая очень важные для регуляции пролиферативной активности клеток и их апоптоза [8]. NO после конъюгации с супероксиданионом направляется по различным путям преобразования пероксинитрита, включая нитрование белков, образование нитрозотиолов, в том числе нитрозотиолов гомоцистеина. Часть этих продуктов усиливает оксидативный стресс и свертываемость крови, тромбообразование. В условиях нарастающего оксидативного стресса за счет генерации активных форм кислорода (АФК) чаще всего снижается активность эндотелиальной NO-синтазы и глутатион-пероксидаз [46]. Это вызывает оправданное

стремление использовать доноры NO в терапевтических целях при недостаточной выработке данного медиатора эндотелиальными клетками. Однако это не всегда целесообразно, хотя бы из-за того, что субэндотелиальные макрофаги также являются источником значительных количеств NO. Кроме того, сам NO представляет парамагнитную молекулу, т.е. свободный радикал, и при неблагоприятных условиях метаболизма способен вызвать, так называемый, нитрозилирующий стресс.

Таким образом, накоплено достаточно большое количество информации об источниках, путях поступления и преобразования оксида азота в биологических системах. Но не все механизмы этого цикла полностью изучены и осмыслены, что требует дальнейших исследований.

Синтез оксида азота в организме

Хорошо известна схема реакций, приводящих к образованию NO из аргинина, описанная М. Марлетта:



где Arg – аргинин, Cit – цитрулин

Один из атомов азота R-цепи аминокислоты L-аргинин – доказанный источник атома азота для молекулы NO, синтезируемой клетками млекопитающих и человека. Катализатор этой реакции – NO-синтаза (NOS).

L-аргинин относится к группе полунезаменимых аминокислот и очень важен в жизнедеятельности организма. Впервые идентифицирован в 1886 г., а 9 лет спустя было показано, что он является продуктом гидролиза белков [34]. Окончательно его структура была установлена в 1910 г. [3]. В дальнейшем были подробно изучены метаболизм L-аргинина и его роль в балансе азота и гомеостазе. Значение этой аминокислоты резко возросло после того, как было установлено, что она является предшественником оксида азота, обладающего широким спектром биорегуляторных влияний.

Ежедневный прием L-аргинина с пищей для взрослого человека в среднем составляет 5,4 г. Из-за высокой активности аргиназы – фермента, разрушающего L-аргинин в слизистой оболочке тонкого кишечника, 40 % поступающего с пищей аргинина разрушается в процессе абсорбции, а остальное его количество поступает в воротную вену [24]. Принимая усвояемость связанного с белком L-аргинина за 90 %, можно считать, что только 50 % пищевого аргинина поступает в системную циркуляцию.

Концентрация L-аргинина в плазме крови колеблется в пределах 95-250 мкмоль/л, в зависимости от возраста и диеты. Его же количество в эндотелиальных клетках сосудов зависит от активности мембраносвязанной транспортной системы. Однако при его дефиците этих клетках разрушение (катаболизм) белков и/или L-аргинин – L-цитрулиновый цикл могут в той или иной степени восполнить этот недостаток до необходимого уровня. Концентрация аргинина в эндотелиальных клетках зависит также от активности аргиназы, которая превращает его в орнитин и мочевину. Различают две изоформы аргиназы: I - конститутивную, II – внепеченочную, которая индуцируется в эндотелиальных клетках липополисахаридами и интерфероном [24].

Аргинин синтезируется при конденсации цитруллина с аспаратом, последующим образованием промежуточного продукта – аргининосукцината, который, распадаясь, образует аргинин и фумарат. Последний связывает цикл карбамида с циклом трикарбоновых кислот.

Ресинтез L-аргинина из L-цитруллина катализируется аргининсукцинатсинтазой и аргининсукцинатлиазой. К переносчикам L-аргинина относятся CAT-1 и CAT-2 – ферменты-транспортеры катионных аминокислот.

Как и другие аминокислоты, L-аргинин участвует в синтезе белка. Неполимеризованный L-аргинин стимулирует секрецию гормонов: инсулина, соматотропина, пролактина, глюкагона и др. Аргиназа (I и II), NOS (три изоформы), аргининдекарбоксилаза, возможно, и другие ферменты

катализируют превращения L-аргинина. К продуктам метаболизма L-аргинина (помимо NO) относятся мочевины, креатин, L-орнитин, L-цитруллин, L-пролин и др.

Внутриклеточная концентрация L-аргинина зависит от его поступления с пищей, синтеза (ресинтеза) в организме, активности транспорта внутрь NO-синтезирующих клеток и обеих изоформ аргиназы, катализирующей расщепление L-аргинина.

Содержание L-аргинина в клетках, синтезирующих NO, повышают интерферон- γ (ИФ- γ) и интерлейкин- 1β (ИЛ- 1β): они ускоряют поступление L-аргинина внутрь клеток и активизируют аргининсукцинатлиазу, катализирующую ресинтез L-аргинина из L-цитруллина. ИЛ-4 и ИЛ-10 повышают активность аргиназ, и тем самым, снижают содержание L-аргинина в клетках, синтезирующих NO.

Биологическую активность NO стимулируют некоторые агонисты - L-аргинин, АХ, брадикинин и др. Но синтез NO является регулируемым процессом и может тормозиться различными аналогами L-аргинина, которые являются конкурентными ингибиторами NOS. При этом N-омега-циклопорил-L-аргинин является селективным ингибитором eNOS, в то время как аминогуанидин – iNOS. Некоторые другие аналоги L-аргинина, такие как N-монометил-L-аргинин (L-NMMA), N-нитро-L-аргининметилэфир (L-NAME), N-нитро-L-аргинин (L-NNA), способны тормозить выработку NO обоими ферментами. Кроме того, образование NO могут замедлять или прекращать гемопротейны, метиленовая синь, супероксид радикалы, этанол, глюкокортикостероиды, индометацин [24, 69].

Синтазы оксида азота. Оксид азота синтезируется при участии 3-х изоформ одноименной NO-синтазы: нейрональной (nNOS, NOS-1), индуцибельной (iNOS, NOS-2) и эндотелиальную (eNOS, NOS-3). Ферменты катализируют пятиступенчатое окисление L-аргинина до L-цитруллина и NO. Все они – гомодимеры с молекулярной массой 130 кДа для iNOS и eNOS, 160 кДа – для nNOS. Мономеры состоят из нескольких доменов. N-концевой

участок содержит гемсвязующий оксигеназный домен, специфичный для каждой изоформы (nNOS человека содержит N-концевую лидерную последовательность, которая отсутствует у eNOS и iNOS; она является высокоомологичной к синтрофинам – семейству белков, локализованных в сарколеме). За оксигеназным расположен кальмодулин-связующий домен, а в С-концевом участке - цитохром Р-450-подобный редуктазный домен с местами связывания для кофакторов. Этот участок отвечает также за NADPH-диафоразную активность NOS. В качестве кофакторов выступают никотинамиддинуклеотидфосфат (НАДФН), флавинадениндинуклеотид (ФАД), флавиномононуклеотид (ФМН) и протопорфирина IX.

Они синтезируют NO в небольшом количестве либо базально, т.е. непрерывно, либо стимулировано - небольшими порциями с помощью факторов, которые воздействуют или через рецепторы, или независимо от них. К рецепторзависимым факторам относятся ацетилхолин, брадикинин, норадреналин, ангиотензин, а также факторы, высвобождаемые из тромбоцитов АТФ, тромбин и серотонин. К независимым факторам относятся основные физические факторы - концентрация кислорода в клетке и напряжение сдвига, смещение крови по отношению к эндотелиальному слою. В регуляции сердечно-сосудистой системы главную роль играет конститутивная eNOS [132, 140].

Активизация iNOS вызывает синтез высоких концентраций оксида азота, которые, в свою очередь, стимулируют Т-клеточное звено иммунитета и могут воздействовать цитотоксически, что отражает возможное участие оксида азота в подавлении некоторых этапов канцерогенеза. iNOS выявлена не только в макрофагах, но и в нейтрофилах, кератиноцитах, фибробластах, хондроцитах, остеокластах, нейронах, астроцитах; в клетках разного эпителия (дыхательного, ретинального, пигментного, ренального, тубулярного), аденокарциномы; в гепатоцитах, островках поджелудочной железы, эндотелии, эндокарде, гладких мышцах сосудов. Фермент активизируется при воспалительных процессах цитокинами или

бактериальными антигенами, а также ультрафиолетом, озоном, никотиновой кислотой, гормонами, которые воздействуют на синтез сАМР (адреналин, глюкагон). Эта изоформа NOS генерирует во много раз большее количество NO по сравнению с другими формами NO-синтаз, не используя при этом Ca^{2+} . Длительность интенсивного синтеза оксида азота составляет около пяти суток. Подобная макрофаговой форме iNOS выявлена на внутренней мембране митохондрий [150].

nNOS участвует в регуляции роста и дифференцировки клеток центральной нервной системы (ЦНС) и, предположительно, в их восстановлении после локальных ишемических повреждений головного мозга [85].

Большинство исследователей считает, что активизация nNOS в медулярных кардиоваскулярных нейронах сопровождается снижением уровня системного артериального давления и уменьшением частоты сердечных сокращений, обусловленных угнетением нисходящих симпатизирующих влияний к сердцу и сосудам [10].

nNOS является Ca^{2+} -зависимой. Нейрональная и эндотелиальная NO-синтазы – это конститутивные ферменты, активизация которых, как правило, связана с немедленными алостерическими модуляциями молекул фермента. В этом заключается ее отличие от iNOS, активность которой возрастает в более отдаленные сроки вследствие активизации экспрессии соответствующих генов. Активность базального уровня конститутивных NOS зависит от физиологического состояния организма. При сахарном диабете, инфаркте миокарда, цереброваскулярных катастрофах и ряде других гипоксических состояниях организма генерация NO в разных тканях активизируется [194].

Изоформа eNOS - главная в обеспечении постоянного базисного уровня NO, который ассоциируют с реализацией механизмов локальной эндотелиальной цитопротекции и поддержанием сосудистого гомеостаза. Снижение активности этой изоформы вызывает эндогенную недостаточность

NO, что является одним из ключевых звеньев патогенеза ишемической болезни сердца (ИБС) и цереброваскулярной патологии. eNOS локализована в клетках эндотелия (ЭК) кровеносных сосудов в растворимой или в мембраносвязанной формах. Локализуется она и в плазматической мембране ЭК, где ассоциируется с кавеолином. В таком состоянии ее активность очень низка. Под влиянием ряда рецепторзависимых стимулов (ацетилхолин, брадикинин, гистамин, тромбин и др.), вызывающих смещение (вытеснение) eNOS из комплекса кавеолин-eNOS и повышающих концентрацию кальция в ЭК, eNOS освобождается из плазматической мембраны, активизируется кальций-кальмодулином, окисляет L-аргинин и синтезирует небольшое количество (пкмоль) NO [183].

Локализация этого фермента в мембране имеет существенное значение для передачи сигнала при участии NO в случае увеличения напряжения сдвига (shear stress), которое возникает вследствие ускорения кровотока, например, при гипоксических состояниях организма [16]. Фермент активизируется при увеличении концентрации внутриклеточного кальция вследствие увеличения напряжения сдвига из-за активизации K^+ -тока. Избыток эндотелиальной NOS возникает также при вазоконстрикции сосудов и под влиянием фактора активизации тромбоцитов (ФАТ) через ФАТ-рецепторы на клетках эндотелия. Синтезированный NO диффундирует к близлежащим гладким мышцам, вызывает образование cGMP, который запускает цепь преобразований: протеинкиназа G активизирует протеинфосфатазу, которая во время дефосфорилирования белков K^+_{Ca} -канала увеличивает K^+ -проводимость через цитоплазматическую мембрану миоцитов. Конформационные изменения ансамбля белков K^+ -канала, индуцированных гиперполяризацией мембраны, снижают проницаемость Ca^{2+} -каналов и уровень Ca^{2+} в клетках падает, что вызывает расслабление миофибрил и, как конечный результат, вазодилатацию.

Фермент eNOS образуется в эндотелиоцитах и тромбоцитах. Ее активность прямо коррелирует с концентрацией внутриклеточного кальция

[29]. Но может также стимулироваться при участии сАМР-зависимой протеинкиназы А, а также сердечного шокового протеина-90. В активизации всех изоформ фермента принимают участие некоторые цитокины.

Изоформы фермента различаются по молекулярной массе и кинетическим константам, их гены локализуются в различных хромосомах. Функционирование конститутивных eNOS и nNOS, в отличие от iNOS, нуждается в увеличении внутриклеточной концентрации Ca^{2+} и активизации кальмодулина. eNOS связана с мембранными структурами клетки, а нейрональная и индуцибельная формы NOS расположены преимущественно в цитозоле. eNOS и nNOS обеспечивают быстрое, ситуативное (в ответ на внеклеточные сигналы медиаторов, физиологически активных веществ и гормонов) изменение уровня NO в организме в физиологических пикомолярных количествах. При инфекциях, воспалительных процессах, травмах, с целью уничтожения микроорганизмов, чужеродных или неопластических тканей индуцибельная изоформа может образовывать NO в микромолярных количествах, что зачастую приводит к его гиперпродукции и, соответственно, приводящей к интоксикации организма. Следует отметить, что во многих клетках представлены как конститутивные, так и индуцибельная NOS. Причем предполагается, что изоформы конститутивных NOS являются частью двух сигнальных путей в клетке [133].

NOS структурно и функционально подобна цитохрому P-450. Она включает редуктазную компоненту (С-конец), содержащую NADPH-связывающий участок, FAD, FMN и оксигеназную компоненту (N-конец), содержащую участок связывания железопорфирина (Fe^{3+}), кальмодулина и кофактора тетрагидробиоптерина. Именно с оксигеназным участком связывается O_2 и L-аргинин, т.е. он является собственно каталитическим участком. Электроны от NADPH перебрасываются по редокс-цепи редуктазного участка (от NADPH к FMN) на кислород, координированный гемом, промежуточным комплексом является пероксидное соединение

гемового железа ($\text{Fe}^{3+}\text{-O-O}^-$). Окисление L-аргинина по гуанидиновой группе приводит к образованию N^g-окси-L-аргинина, который и отщепляет NO, превращаясь в L-цитруллин. Структурно-функциональной особенностью NOS является ее димерная структура и димеризация субъединиц в участке N-конца. В условиях недостатка кофактора тетрагидробиоптерина eNOS способна продуцировать O_2^- или H_2O_2 [61]. Предложена модель, согласно которой при концентрациях тетрагидробиоптерина, намного меньших 10^{-9} М, продуцируется O_2^- , при концентрациях 10^{-9} - 10^{-6} М - пероксинитрит, а выше 10^{-6} М - оксид азота [61]. При недостатке L-аргинина NOS также продуцирует H_2O_2 , т.е. проявляется ее NADPH-оксидазная активность. Есть данные, что NOS постоянно продуцирует H_2O_2 даже при оптимальных количествах кофактора и субстрата. Существуют работы, в которых показано прямое образование в NOS-реакции нитрит-аниона NO_2^- [21], нитрат-аниона NO_3^- [25] либо пероксинитрита ONOO^- . Интересно, что при избытке NO относительно O_2^- , например при увеличении активности супероксиддисмутазы (СОД), пероксинитрит восстанавливается до NO_2^- [24]. Образующийся в NOS-реакции NO может быть окислен в NO_3^- оксигемоглобином или оксимиоглобином тканей.

Все эти данные указывают на возможность NOS продуцировать ряд активных кислородных молекул (АКМ), кроме NO (в том числе и H_2O_2). Таким образом, NOS следует рассматривать как сложный ферментный комплекс, синтезирующий высокоактивные соединения в зависимости от различного функционального состояния клетки.

Показано, что клетки не вырабатывают NO, если активность СОД низкая. Возможно, это связано с защитой клетки от чрезмерной продукции токсичного пероксинитрита, который образуется в реакции между супероксиданионом и NO. Известно, что NOS могут активизировать активные кислородные молекулы [10]. Можно предположить, что генерация АКМ при действии физиологических стимулов либо при патологии усиливает работу как СОД, так и NOS. Это частично объясняет механизмы

взаимосвязи биосинтеза NO и H₂O₂. Кроме того, усиление синтеза NO может также усиливать продукцию H₂O₂ через подавление каталазной активности [23].

С другой стороны, показано, что H₂O₂, образуя супероксид-анион, угнетает базальную продукцию NO эндотелием [26], а NO может связываться с гемовыми группами ферментных комплексов, продуцирующих АКМ, ингибируя их каталитическую активность и снижая синтез H₂O₂ [11]. Таким образом, механизмы образования и снижения биосинтеза NO и H₂O₂ могут быть согласованы, что предотвращает гиперпродукцию этих метаболитов в ткани.

Еще одним источником NO в клетке могут служить нитрит-редуктазные реакции, роль которых возрастает в условиях гипоксии.

Конститутивные NOS функционально связаны с плазмалеммой. Ацилирование жирными кислотами ассоциирует eNOS с плазмалеммой и повышает ее активность [13, 16], тогда как фосфорилирование по остаткам серина вызывает диссоциацию и снижение активности. Благодаря специфической аминокислотной последовательности nNOS может быть связана с гликопротеидными комплексами плазматической мембраны (ПМ).

Время полужизни свободного NO в различных тканях варьирует от 500 мс до нескольких секунд, что определяется реакционной способностью окружения, особенно наличием связывающих NO железопорфириновых ядер [19]. Относительная химическая стабильность, ассоциация NOS с ПМ, небольшой молекулярный радиус и высокий коэффициент диффузии позволяют NO проявлять свою биологическую активность как в клетке, где он синтезируется, так и во внеклеточном пространстве.

Гиперпродукция NO клеткой, особенно при повышенной концентрации супероксида, привела бы к образованию целого спектра токсичных АКМ, поэтому должны существовать механизмы, снижающие уровень NO. К ним относятся процессы ингибирования активности NO-

синтаз продуктами реакции, нитрозилирование мембранных и цитозольных тиоловых групп, связывание NO с железосерными центрами и гемовыми группами, окисление NO в $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ относительно менее реакционноспособные его метаболиты. Увеличение уровня cGMP в клетке под действием NO [46] прекращает передачу сигнала по Ca^{2+} -фосфатидилинозитидному пути. Снижение синтеза NO достигается также фосфорилированием NOS протеинкиназой C (PKC).

Источником H_2O_2 в клетках служат, в основном, другие АКМ, в первую очередь супероксид-анион. Показано [126], что вход внеклеточного Ca^{2+} в цитозоль при стимуляции клетки играет важнейшую роль в процессах генерации АКМ. Таким образом, в условиях *in vivo* имеют место следующие процессы: связывание лиганда с рецептором, трансдукция сигнала через ПМ, генерация АКМ клеткой.

Индукцированный ионофорами или агонистами вход Ca^{2+} в клетку активизирует PKC и кальмодулинзависимые киназы. Эти процессы вызывают фосфорилирование NADPH-оксидазы, ее самосборку и последующую активизацию. Существует точка зрения, что мембранно-связанная NADPH-оксидаза отвечает за значительную часть генерируемых клеткой АКМ. Показано, что NO ингибирует активность этого фермента [134]. Вход Ca^{2+} в клетку стимулирует также фосфолипазу A_2 и далее образование арахидоновой кислоты, последующий окислительный метаболизм которой усиливает продукцию АКМ. NO усиливает обмен арахидоновой кислоты по липоксигеназному пути.

Стимуляция клетки усиливает фосфатидилинозитидный обмен через активизацию фосфолипазы C. Образующийся диацилглицерол (ДАТ) может быть источником арахидоновой кислоты и обеспечивает PKC-зависимое образование АКМ [19].

Арахидоновая кислота также интенсифицирует самосборку NADPH-оксидазного комплекса и способна активизировать PKC [21].

Кроме вышеприведенных систем генерации АКМ следует также отметить ксантиноксидазную реакцию, усиливающуюся в условиях гипоксии, а также образование АКМ митохондриями - механизм, обеспечивающий базальную продукцию супероксид-аниона клеткой. Кроме того, супероксид-анион может быть промежуточным продуктом окисления флавинов, хинонов, катехоламинов и т.д. [129, 144].

Усиление биосинтеза АКМ, особенно O_2^- , в клетке как результат лигандзависимой стимуляции или при патологии стимулирует СОД, катализирующую реакцию превращения супероксид-аниона в H_2O_2 [15, 24].

Ксантиноксидаза, флавиновые оксидазы и ряд гемсодержащих белков способны непосредственно синтезировать H_2O_2 . Известно, что H_2O_2 может также образовываться в митохондриях. Все эти ферментные системы потенциально способны генерировать H_2O_2 как при действии физиологических стимулов, так и при окислительном поражении тканей. Предполагается, что H_2O_2 является необходимым элементом внутриклеточной передачи сигнала в эукариотической клетке.

Генерация H_2O_2 происходит в основном на ядерной, плазматической мембранах, а также на мембранах митохондрий. Эта форма АКМ относится к окислителям средней силы и является относительно малоактивной. Поэтому при низкой концентрации каталазы, глутатионпероксидазы и ионов переходных металлов она относительно стабильна и может мигрировать в клетках и тканях, что указывает на ее возможную роль в паракринной регуляции [131].

Повышение уровня H_2O_2 в клетках активизирует ферментные системы, ее расщепляющие и угнетает системы, ее продуцирующие. В снижении уровня H_2O_2 могут принимать участие и другие АКМ, в частности NO. Эти процессы предотвращают образование цитотоксичных радикалов, вследствие гиперпродукции H_2O_2 . К механизмам снижения уровня H_2O_2 в цитозоле можно отнести активизацию каталазы, пероксидазы, глутатионпероксидазы, расход H_2O_2 на окисление мембранных и

цитозольных тиоловых групп [184] и т.д. В процессе инактивации H_2O_2 важнейшую роль играет глутатионпероксидаза, локализованная в цитозоле и эффективно работающая при малых концентрациях H_2O_2 .

Вследствие того, что H_2O_2 активизирует растворимую гуанилатциклазу (pГЦ) [10, 24], а cGMP прерывает путь трансдукции сигнала на уровне фосфолипазы C, то этот механизм способен снижать биосинтез H_2O_2 на ранних этапах передачи сигнала.

Иными словами, клетка как в относительном покое, так и при возбуждении поддерживает на определенном уровне концентрацию цитозольного H_2O_2 , способного диффундировать во внеклеточное пространство.

Таким образом, механизмы образования и утилизации NO и H_2O_2 взаимосвязаны, поэтому метаболизм обоих АКМ должен происходить согласованно. К общим закономерностям биосинтеза и утилизации NO и H_2O_2 можно отнести: активизацию Ca^{2+} -фосфатидилинозитидного обмена и усиление входа Ca^{2+} в клетку, приводящие к согласованной стимуляции биосинтеза NO и H_2O_2 ; способность NOS во многих случаях к генерации H_2O_2 ; взаиморегуляция и в некоторых случаях взаимостимуляция биосинтеза NO и H_2O_2 ; снижение продукции обоих АКМ клеткой, происходящее cGMP-зависимым путем по механизмам отрицательной регуляции в Ca^{2+} -фосфатидилинозитидной системе, а также перекрестное взаимоингибирование ключевых ферментов биосинтеза NO и H_2O_2 .

Отмечено 5 основных факторов, влияющих на скорость NOS-зависимого синтеза NO:

- 1) скорость транскрипции генов, ответственных за синтез NOS, с ДНК на матричную РНК (мРНК);
- 2) созревание мРНК-NOS; экспорт мРНК-NOS в клеточные локусы, в которых происходит синтез белка;
- 3) содержание BH_4 , НАДФН, ФАД, ФМН и протопорфирина IX в клетках, синтезирующих NO;

- 4) ферментная активность синтезированных молекул NOS, химическая устойчивость молекул NOS;
- 5) концентрация L-аргинина внутри клеток, синтезирующих NO.

Факторы 1 и 2 влияют на количество синтезируемых молекул NOS, но не на их ферментную активность. Факторы 3, 4 и 5 - посттрансляционные.

Снижение pH в цитоплазме клетки не влияет на количество молекул mPHE-NOS в клетке, на синтез молекул NOS клеткой, но препятствует участию НАДФН в NOS-зависимом синтезе NO.

Тканевая гипоксия, с одной стороны, замедляет NOS-зависимый синтез NO из L-аргинина и O₂, так как O₂ одно из реагирующих веществ в реакции NOS-зависимого синтеза NO. С другой стороны, имеются сведения о повышении ферментной активности NOS под влиянием гипоксии. Избыток O₂ (например при гипербарической оксигенации) уменьшает содержание NO во внутренней среде организма за счет окисления NO до нитритов и нитратов.

Обсуждается возможность NOS-зависимого синтеза NO из оксимных соединений, так как они являются альтернативными (помимо L-аргинина) субстратами NOS и альтернативными источниками атома азота для NO. Предполагают, что в очагах ишемии возможно образование NO нитритным путем без участия NOS, кислорода и L-аргинина, а также за счет реакции между аргинином и перекисью водорода.

Срок полужизни белка NOS достаточно короткий (15-20 час.), он подвергается фосфорилированию по тирозиновым, сериновым остаткам или по 495-у остатку треонина и, конечно, может легко окисляться под действием как монооксида азота, который он сам синтезирует, так и других окислителей (супероксиданион-радикал, пероксид водорода) [129].

В норме у здорового человека количество NO, образующееся в организме, составляет в среднем 1 ммоль/сут. Однако суммарная скорость синтеза NO в организме не всегда отражает скорость синтеза NO в каждом отдельно взятом анатомическом локусе. Ввиду малого радиуса действия NO

(не более 0,5 мм) имеют значение анатомическая локализация биосинтеза NO и транспорт двухатомного комплекса NO в составе других молекул [3, 69].

Повышенная скорость NOS-зависимого синтеза NO в целом организме, отмечаемая при инфекционных, аллергических, аутоиммунных заболеваниях и травмах, означает, что во многих микроанатомических локусах скорость синтеза NO повышена. Избыточный NOS-зависимый синтез NO можно разделить на две составляющие: физиологически необходимый синтез NO и дополнительный (помимо физиологического) - как следствие болезни.

Ранее считалось, что NOS-зависимый синтез физиологически необходимого количества NO осуществляется за счет eNOS и nNOS, но не за счет iNOS, а NOS-зависимый синтез дополнительного количества NO вследствие болезни (не онкологической) осуществляется только за счет iNOS. В этом кроется ответ на вопрос, почему iNOS получила название индуцибельной NOS (из-за индуцированного болезнью синтеза) и почему eNOS и nNOS условно объединили в одну конститутивную NOS [15].

В последующих работах выявлено участие iNOS в физиологическом синтезе NO и участие eNOS и nNOS в дополнительном синтезе NO при инфекционных, аллергических и аутоиммунных заболеваниях. Активизация iNOS – составная часть многих защитно-адаптационных реакций. В настоящее время уже говорят о базальной NO-синтетической активности iNOS и ее роли в регуляции сосудистого тонуса [6].

Активность eNOS в гипоталамусе повышается при инфекционной антигенемии. В легочной ткани больных бронхиальной астмой повышается активность eNOS и/или iNOS и/или nNOS. В клетках мозговой ткани почек крыс, подвергнутых обезвоживанию, отмечалось 3-5-кратное повышение содержания молекул мРНК eNOS, iNOS и nNOS, т. е. всех трех изоформ NOS. Аллергический энцефаломиелит характеризуется повышением активности iNOS и nNOS в стенке сосудов в очагах поражения ЦНС. Развитие портальной гипертензии повышает активируемость nNOS слизистой

оболочкой желудка, что считается одной из причин расширения сосудов в слизистой оболочке желудка [79].

Перфузия портальной крови через кровеносные капилляры печени - необходимое условие деконтаминации портальной крови, в том числе от бактерий, проникших в портальную кровь из кишечника. Поступление крови из кишечных вен в легкие в обход печени (по портокавальным анастомозам) - маршрут проникновения кишечных бактерий в легочную ткань, в которой их антигены активизируют iNOS и nNOS. Избыточный NOS-зависимый синтез NO в легочной ткани и вазодилатационные свойства NO – причины расширения кровеносных капилляров легких, из-за чего уменьшается соотношение площади кровеносных капилляров легких (площади диффузии кислорода) и объема кровеносных капилляров легких, развивается гипоксемия (гепатопульмональный синдром).

Одно из проявлений генетически обусловленного дефицита eNOS стойкая артериальная гипертензия. Врожденные пороки сердца у детей, осложненные цианозом, характеризуются снижением NO-синтетической активности eNOS в миокарде. Изоформа nNOS участвует в регуляции артериального давления, ее активизация снижает артериальное давление. Один из гипотензивных механизмов антагонистов рецепторов ангиотензина II связан с повышением активности nNOS; ее снижение в коре головного мозга отмечают при шизофрении и других психозах. Если селективные блокаторы iNOS уменьшают, то неселективные блокаторы NOS (блокаторы сразу всех трех изоформ NOS одновременно), наоборот, усугубляют морфологические признаки повреждения слизистой оболочки желудка, вызванного воздействием липополисахаридами, этиловым спиртом и желчью [187].

Ферментная активность различных изоформ NOS оценивается количеством NO, образующимся в единицу времени. Инфекционные, аллергические, аутоиммунные заболевания и травмы индуцируют повышенный NOS-зависимый синтез NO в целом организме с преобладающим участием iNOS: при указанных патологических процессах

NO-синтетическая функция iNOS более чем в 1000 раз превосходит eNOS и nNOS [132, 160].

Остеоциты в норме содержат ферментные молекулы nNOS. Все 3 изоформы NOS обнаруживаются в надкостнице во время заживления переломов. Катализируемый iNOS синтез NO хондроцитами и остеобластами ускоряется цитокинами с преимущественно провоспалительным действием. Глюкокортикоиды не оказывают на NOS-зависимый синтез NO в костной ткани того ингибирующего влияния, которое они оказывают на NOS-зависимый синтез NO в макрофагах. Возможно, поэтому (а не только из-за побочного действия глюкокортикоидов) в лечении артритов широко применяются нестероидные противовоспалительные средства [56].

NO, обладая антимикробными свойствами, защищает внутреннюю среду организма от проникновения в нее микроорганизмов через кожу, конъюнктиву глаз, слизистые оболочки полости рта, дыхательных путей, желудочно-кишечного тракта и др. [187]. Клетки этих органов и тканей осуществляют NOS-зависимый синтез NO, который трудно разделить на физиологический и избыточный, так как на границах между окружающей и внутренней средой организма скапливаются микроорганизмы, антигены, токсины и т.д.

Осуществляемый купферовскими клетками печени и гепатоцитами NOS-зависимый синтез NO также трудно разделить на физиологический и избыточный, так как из просвета кишечника в портальный кровоток проникают кишечные микроорганизмы, антигены, токсичные вещества и т.д. Микробы, антигены и токсины, оказавшиеся в портальном кровотоке, могут иметь внекишечное происхождение. Если в крови высокие концентрации антигенов вирулентных микроорганизмов, если ускорилась секреция провоспалительных цитокинов в кровь, если из обширного некротического очага продукты распада проникли в кровоток, то гепатоциты реагируют дополнительным NOS-зависимым синтезом NO. Если местные повреждения

(внепеченочные) незначительны, то NOS-зависимый синтез NO в гепатоцитах не ускоряется [103].

Показано, что в организме млекопитающих около 50% нитратов образуется из аммиака. Он, включаясь в глутамат, аспартат и цикл мочевины, может участвовать в синтезе NG-группы аргинина с последующим ее окислением в NO и дальше в нитрит- и нитрат-ионы. Но нельзя исключить и возможность окисления аммиака в нитраты, близкого к тому, что осуществляется микроорганизмами почвы при нитрификации. В этом окислении могут участвовать, например, кишечная микрофлора и тканевые ферменты. При этом помимо NO возможно образование гидроксиламина и закиси азота, физиологическая роль которых также может оказаться очень важной [69].

Конечные продукты обмена NO в организме млекопитающих и человека - анионы NO_2 и NO_3 . Почки выводят более 90 % NO_2 и NO_3 , которые образуются из синтезируемого организмом NO. Соли нитритов и нитратов хорошо растворимы в воде, не депонируются в клетках. Анионы NO_2 и NO_3 могут также аккумулироваться в асцитической и плевральной жидкости. Если поступление NO_2 и NO_3 в организм с водой и пищей считать неизменным, если в серозных полостях не скапливается жидкость, то колебания мочевой экскреции NO_2 и NO_3 адекватно отражают изменения скорости биосинтеза NO.

Пути метаболизма NO в организме

Оксид азота выполняет свои физиологические функции и подвергается метаболизму одним из трех основных способов, причем время полужизни составляет несколько секунд [30].

Основной путь метаболизма – это реакция с гемопротейнами. Во-первых, многообразные клеточные эффекты NO (расслабление гладких миоцитов и т.д.) запускаются при связывании окиси азота с гемсодержащим

ферментом гуанилатциклазой. Во-вторых, NO быстро реагирует с гемоглобином эритроцитов, образуя метгемоглобин и анионы NO_2^- и NO_3^- [33].

Второй путь метаболизма NO, объясняющий цитотоксичность окиси азота: реакция с супероксид-анионом (O_2^-), через пероксинитрит (ONOO^-) приводящая к образованию гидроксил-радикала ($\text{OH}^\cdot$). Оба этих вещества оксиданты, высокоактивные в отношении липидов, белков и нуклеиновых кислот [32,33].

Третий путь метаболизма: образование нитрозотиолов в быстрой обратимой реакции. Возможно, нитрозотиолы, присутствующие в плазме человека - стабилизированная форма NO в биологических тканях [32].

Патобиохимия системы оксида азота

Как межклеточный и внутриклеточный мессенджер NO участвует в регуляции разнообразных метаболических реакций, обеспечивающих жизнеспособность и функциональную активность клеток и всего организма в целом. Но при определенных условиях он участвует и в патологических процессах. Такое «двуликое» действие NO определяется химическими свойствами молекулы и реализуется тем или иным способом в зависимости от его концентрации, времени воздействия и условий обмена в различных типах клеток и тканях организма. NO представляет собой нейтральный радикал с неспаренным электроном. Он имеет наиболее высокий по сравнению с другими молекулами организма коэффициент диффузии (даже больше, чем у O_2 и CO_2) и беспрепятственно проникает через клеточные мембраны.

Несмотря на радикальные свойства, NO слабо реагирует непосредственно с тиолами и аминами, но легко вступает в реакции с железом, O_2 и особенно с супероксидом (O_2^-). Эта реактогенность ограничивает время его жизни (приблизительно 10 сек.) и радиус действия в тканях - не превышает 500 мкм. Тем не менее, такой протяженности

распространения достаточно, чтобы NO мог принимать самостоятельное участие в коммуникации - внутриклеточной и между соседними клетками. Позднее было показано, что биологическое время полужизни NO в паренхимных (экстравазкулярных) тканях изменяется в пределах 0,09-2 сек., в зависимости от концентрации O_2 . NO влияет на уровень O_2 в тканях через угнетение клеточного дыхания и тем самым контролирует время собственной полужизни [3, 8].

Оксид азота ингибирует опосредуемые Fe^{3+} оксидативные реакции и тем самым проявляет антиоксидантное действие. Кроме того, NO тормозит процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ), препятствуя, очевидно, их распространению. Мишенями прямого действия NO являются также Cu и Zn, входящие в состав ферментов, и высокоэнергетические свободные радикалы (радикалы с углеродным центром, липидные, диоксида азота). Прямые эффекты NO доминируют в организме в физиологических условиях, когда он синтезируется, преимущественно конститутивными формами NOS в небольшом количестве: 0,1-1 мкмоль, в то время как O_2^- из-за высокой супероксиддисмутазной активности – меньше на три порядка.

Непрямое действие оксида азота опосредуется через его реактивные формы (RNOS) - продукты реакции NO с O_2 , O_2^- или H_2O_2 . В образовании RNOS могут принимать участие также и переходные металлы. Непрямое влияние NO проявляется при увеличении его синтеза, связанного с индукцией iNOS при воспалительных процессах различной этиологии (при активировании фагоцитарных клеток концентрация NO возле них может достигать 10 мкмоль), и сочетается с усилением образования реактивных форм кислорода (ROS) [38]. Это действие NO реализуется через S-, N- и O-нитрозирование. При этом катион нитрозония (NO^+) присоединяется к аминам, тиолам или гидроксильным группам ароматических соединений, через нитрование, т.е. присоединением нитрогруппы (NO_2) к биомолекулам (наиболее чувствительны к нитрованию ароматические кольца, в частности тирозина), а также через окисление или

гидроксилирование биомолекул. Вследствие таких реакций образуются посттрансляционные модификации белков, которые играют существенную роль в патогенезе острых и хронических заболеваний. Соотношение между перечисленными типами модификаций биосубстратов и их выраженность зависят от условий метаболизма, прежде всего окислительно-восстановительного потенциала, pH и баланса между образованием NO и ROS в клеточных компартментах. Эти условия обозначаются как состояние нитрозативного и оксидативного стресса. Основными реактивными формами оксида азота, которые при их избытке приводят организм в состояние нитрозативного и оксидативного стресса, являются соответственно диазоттриоксид (N_2O_3) и пероксинитрит ($ONOO^-$). Но между указанными состояниями нет четких границ, так как N_2O_3 , легко вступая в реакции S- и N-нитрозирования, способен при определенных условиях участвовать в окислительных реакциях, а $ONOO^-$ как сильный окислитель может нитровать и нитрозировать биомолекулы. Прямое и косвенное действие NO в клеточных компартментах происходит одновременно, но выражено неодинаково из-за различий в синтезе NO и O_2^- , а также потому, что O_2^- из-за наличия заряда плохо диффундирует сквозь мембраны [41].

Большинство реактивных форм кислорода (РФК) имеют на своей внешней орбите неспаренный электрон и являются свободными радикалами кислорода (СРК). Это - супероксидный анион (O_2^-), гидроксильный радикал ($HO^\cdot$), оксид азота ($NO^\cdot$) и липидные радикалы. Другие РФК – гидрогенная перекись (H_2O_2), пероксинитрит ($ONOO^-$) и гипохлорная кислота ($HOCl$) – не являются СРК, но обладают сильными оксидантными свойствами [21].

В условиях нормальной жизнедеятельности организма некоторые РФК выполняют регуляторные функции и имеют определенное адаптационно-компенсаторное значение. Однако их избыток (оксидантный стресс) при многих сердечно-сосудистых заболеваниях и их факторах риска [93, 98] позволяет им преодолевать защитную функцию антиоксидантных механизмов клетки и превратиться в сильный патогенный фактор, окисляя и

нарушая функции некоторых биологических макромолекул - ДНК, белков, липидов.

Следует отметить, что продукция какой-либо одной РФК может вызывать образование нескольких других РФК. Например, взаимодействие РФК и полиненасыщенных жирных кислот в клеточной мембране формирует перокси-радикалы жирных кислот ($R-COON$), которые «атакуют» расположенные рядом жирные кислоты, инициируя образование других липидных радикалов [176]. Все они накапливаются в клеточной мембране и могут неблагоприятно влиять на функции клетки, что ведет, в частности, к дисфункции мембранно-связанных рецепторов. Конечные продукты перекисного окисления липидов, включая ненасыщенные альдегиды и другие метаболиты, обладают сильными цитотоксическими и мутагенными свойствами.

Избыток РФК существенно нарушает функции эндотелия сосудов: торможение эндотелийзависимой вазодилатации, увеличение синтеза адгезивных молекул (что вызывает прилипание и проникновение моноцитов в сосудистую стенку, превращению их в макрофаги) и различного рода факторов роста, повышение агрегации тромбоцитов и тромбообразования, активности апоптоза и др. В целом возникает выраженная дисфункция сосудистого эндотелия [94]. Среди патогенных эффектов необходимо также отметить и усиление пролиферации гладкомышечных клеток, что ведет к гипертрофии и ремоделированию стенки сосудов, утолщению их медиального слоя, нарушению состава внеклеточного матрикса и структуры артериальной стенки в целом [98]. Увеличение массы гладких мышц сосудов усиливает их сокращение и сужает просвет в ответ на разного рода сосудосуживающие влияния.

Показано, что супероксид-анион способен тормозить экспрессию и активность eNOS, а также связывать и инактивировать NO, уменьшая его концентрацию в эндотелиальных клетках (ЭК) [90, 91]. Благодаря этому он подавляет опосредуемое NO сосудорасширяющее действие

эндотелийзависимых вазодилататоров. Наряду с прямым вазоконстрикторным эффектом [99], а также повышением синтеза эндотелина [29] он в еще большей степени увеличивает сократимость артерий, как это имеет место при артериальной гипертонии [95] и других сосудистых заболеваниях [100].

Противоположные по направленности влияния O^- и NO на параметры сосудистого эндотелия указывают на то, что их изменения могут быть в той или иной степени обусловлены подавлением eNOS.

Необходимо иметь в виду, что и супероксид-анион, и NO являются свободными радикалами кислорода. Они вступают в реакцию друг с другом, протекающую с исключительно высокой скоростью - в 3 раза быстрее скорости реакции супероксид-аниона с СОД и антиоксидантом. Поэтому можно вполне обоснованно полагать, что в любой момент жизнедеятельности ЭК может случиться взаимодействие между супероксид-анионом и NO. Однако в физиологических условиях эндогенная антиоксидантная защита минимизирует это взаимодействие и поддерживает некий баланс между O_2^- и NO. Сдвиг этого равновесия (при патологических состояниях) в сторону супероксид-аниона вызывает образование высокотоксичного пероксинитрита ($ONOO^-$) [94, 101], вызывающего повреждение мембран и ДНК клетки, мутации, апоптоз, развитие воспалительных процессов, перекисное окисление липидов и другие нарушения.

Источником образования РФК могут быть различные биохимические процессы: активизация ксантиноксидазы, метаболизм арахидоновой кислоты (по циклоксигеназному, липооксигеназному, цитохром-Р450-монооксидазному путям) и др.

Наибольшее значение имеют, по-видимому, мембранно-связанные оксидазы, которые используют NADH и NADPH в качестве субстратов для переноса электронов к молекуле кислорода.

Активность этих NADH/NADPH-оксидаз регулируется ангиотензином-2 [147], а также некоторыми цитокинами [110]. Показано, что обработка ЭК в культуре наномолярных количеств ангиотензина-2

существенно повышает активность NADH/NADPH-оксидаз и снижает уровень NO [147]. Повышенное образование супероксида NADH-оксидазой и участие при этом ренин-ангиотензиновой системы возникает местно и на ранней стадии атеросклероза, а также при других сердечно-сосудистых заболеваниях [110].

Следует отметить, что длительное применение с лечебной целью нитроглицерина также сопровождается повышением активности NADH/NADPH-оксидаз и образованием супероксид-аниона [157]. Наблюдающаяся при этом толерантность к нитроглицерину может быть скорректирована назначением гидролазина, а также липосомальной СОД и других антиоксидантов [157].

Следует отметить непосредственное взаимодействие NO с железом, обусловленное многими физиологическими и токсическими эффектами. NO обратимо связывается с гемовым железом гуанилатциклазы, циклооксигеназы, каталазы, липоксигеназы, NOS-аз, цитохрома P-450 и пероксидаз, цитохромов электронтранспортной цепи митохондрий, а также с гемовым железом оксигемоглобина [9]. В этом ряду ферментов исключительно важная роль принадлежит гуанилатциклазе. Вследствие связывания NO с Fe^{2+} (ферро-ионом) порфиринового кольца гуанилатциклазы активность фермента увеличивается в сотни раз [79]. Синтезирующийся при этом cGMP через соответствующие протеинкиназные реакции участвует в регуляции тонуса сосудов; реакциях иммунитета; нейромедиации; угнетении агрегации тромбоцитов и опосредовании их взаимодействия с ЭК; в контроле функций различных типов мышц, поджелудочной железы, остеокластов; в развитии болевого эффекта, эрекции и др. Показана возможность вовлечения cGMP-зависимого пути в цитопротекторное действие NO. Но при септических состояниях, травмах, ожогах и кровопотерях именно с индуцированной высокими концентрациями NO гуанилатциклазой и фосфорилированием сократительных белков в гладкомышечных волокнах стенок сосудов связывают развитие вазоплегии,

гипотензии и шока. Все другие гемсодержащие ферменты, в отличие от гуанилатциклазы, при взаимодействии с NO ингибируются независимо от валентности гемового железа в их активном центре. Например, каталаза, содержащая в геме Fe^{3+} (ферри-ион), также ингибируется NO. Угнетение активности гемовых ферментов может привести к снижению дыхательной функции митохондрий, биотрансформации ксенобиотиков и эндогенных субстратов (стероидов, ненасыщенных жирных кислот, в частности, арахидоновой кислоты и простагландинов), а также синтеза NO [70]. Показано, что гиперпродукция NO в гепатоцитах снижает содержание каталазы и цитохрома P-450 вследствие обратимой диссоциации гема от апофермента [10]. Кроме того, NO угнетает активность феррохелатазы, участвующей в синтезе гема, очевидно через разрушение ее негемового железосерного центра. Эти данные, возможно, объясняют причину повышения чувствительности к лекарствам у больных с септическими и воспалительными состояниями. В реакции с оксигемоглобином NO окисляется в нитрат и образует метгемоглобин, что нарушает кислородтранспортную функцию крови и приводит к гемической гипоксии.

NO в условиях гиперпродукции, может непосредственно связываться в тканях организма с негемовым железом и парными тиоловыми группами низкомолекулярных лигандов, пептидов и белков, образуя динитрозильный комплекс негемового железа (DNIC). Он является парамагнитным, и величина его прямо зависит от уровня NO в тканях. С искусственным низкомолекулярным лигандом – диэтилдитиокарбаматом (DETC) – может образовываться мононитрозильный комплекс железа.

Эндогенное образование DNIC становится возможным из-за присутствия в цитозоле клеток так называемого свободного фонда железа (СФЖ). Это железо, очевидно, из-за высоких концентраций аскорбиновой кислоты, глутатиона и других восстановителей, находится в виде ферриона, слабо связанного с различными низкомолекулярными органическими

хелаторами (цитратом, изоцитратом, пируватом, фосфатом, АТФ, АДФ), а также SH-группами белков, липидами мембран и свободным гемом. Известны и другие названия СФЖ: внутриклеточный фонд транзитного железа, редокс-активное, обмениваемое или метаболически и каталитически активное железо, которые хорошо отражают его состояние и функцию. СФЖ восполняется за счет эндоцитоза Fe^{3+} -трансферрина (Fe^{3+} -Tf) в эндосомы клеток. Fe^{3+} -Tf из внеклеточной среды доставляется к эндосомам с помощью трансферринового рецептора. В эндосомах протонная помпа (тип V АТФ-азы) поддерживает кислую среду, в которой высвобождается железо и апотрансферрин. Далее две молекулы железа переносятся из эндосом в цитозоль транспортером двухвалентных металлов – DMT1, а апотрансферринрецепторный комплекс возвращается обратно на клеточную поверхность. Из цитозоля железо транспортируется в митохондрии для синтеза гема, включается в соответствующие негемовые ферменты, например рибонуклеотидредуктазу, необходимую для синтеза DNA, а после окисления в ферро-ион, включается в ферритин для внутриклеточного сохранения в безопасном виде. Значительное количество хелатированного и редоксактивного железа определяется в лизосомах, где разрушаются металлопротеины. СФЖ обнаруживают и в ядрах, где его концентрация составляет 0,2-3,0 % от его клеточного фонда и поддерживается на нетоксичном уровне (3-10 мкмоль) с помощью специальных механизмов. При оксидативном стрессе фонд свободного железа значительно возрастает вследствие высвобождения его в виде Fe^{3+} из белков (железосерных кластеров ферментов, трансферрина, ферритина, гемовых белков) в результате окисления [69]. Токсичные свойства свободного железа связаны с его способностью катализировать реакцию Хабера-Вейса ($\text{Fe}^{3+} + \text{O}_2^{\cdot-} \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{O}_2$, $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{HO}^{\cdot} + \text{HO}^-$; ее суммарный вид: $\text{O}_2^{\cdot-} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + \text{HO}^- + \text{HO}^{\cdot}$), в результате которой образуется гидроксильный радикал, способный окислять белки, разрушать липиды клеточных мембран и ДНК. Имеются доказательства того, что NO,

ингибируя эту реакцию, проявляет антиоксидантные свойства [81, 123, 146].

Объем свободного фонда железа регулируется на посттрансляционном уровне с помощью железорегулирующих белков (IRP1 и IRP2), которые, взаимодействуя с определенными участками мРНК, контролируют синтез Tf-рецептора-1 и ферритина. Кроме того, IRP1 и IRP2 через соответствующие мРНК влияют на синтез некоторых ферментов, содержащих негемовое железо. Интересно, что IRP1 является апоферментом цитоплазматической аконитазы. Увеличение поступления железа в клетки способствует присоединению к апоферменту железосерного кластера ($[4\text{Fe-4S}]$), вследствие чего апофермент приобретает свойства аконитазы и превращает цитрат в изоцитрат. Присоединение $[4\text{Fe-4S}]$ -кластера к апоферменту обратимо и может регулироваться посредством его фосфорилирования [15, 114, 125].

Свободное железо при усилении эндогенного синтеза и поступления из экзогенных источников NO легко образует DNIC с цистеином и глутатионом. Эти низкомолекулярные DNIC (нмDNIC) - более стабильные образования, чем NO. Если время существования оксида азота в биологической среде исчисляется секундами, главным образом из-за его быстрого взаимодействия с супероксидом, то нмDNIC устойчивы в течение минут [119]. Поэтому они могут перемещаться между внутриклеточными компартментами и клетками, осуществляя паракринную функцию как доноры NO и не только. По сравнению с NO и низкомолекулярными S-нитрозотиолами они являются более сильными нитрозирующими агентами и эффективнее взаимодействуют с белками. Мишенями атаки нмDNIC могут быть свободные SH-группы белков, гистидин, аспартат и глутамин. При этом в белках могут образовываться DNIC, S-нитрозотиолы и N-нитрозотиолы. Одной из мишеней воздействия нмDNIC является обширная группа белков, содержащих негемовое железо в виде железосерных кластеров. К ним относятся митохондриальные белки электронтранспортной цепи (комплекс I – NADH-убихинон оксидоредуктаза

и комплекс II – сукцинатубихинон оксидоредуктаза) и цисаконитаза, а также ферменты ксантиноксидаза и альдегидоксидаза, глутаматсинтаза, дигидрооротатдегидрогеназа и др. [21].

Было показано, что при взаимодействии нмДНИС с адренооксином (белком монооксигеназной системы), в структуру которого входит бинуклеарный железосерный (Fe_2S_2) центр (ISC), последний деградирует с образованием динитрозильного комплекса железа, связанного с SH-группами этого белка. При этом из железосерного центра высвобождается Fe^{2+} , что, в свою очередь, способствует образованию нмДНИС и дальнейшей деградации адренодоксина. Формирование ДНИС в адренодоксине с одновременным разрушением этого центра происходит также при воздействии на белок NO в присутствии Fe^{2+} , но сам оксид азота не эффективен. Возможно, что данный механизм распространяется и на другие интегрированные в структуры или находящиеся в цитозоле белки, содержащие железосерные кластеры. Следует отметить, что на железосерные кластеры некоторых ферментов NO может действовать непосредственно и даже более эффективно, чем нмДНИС. Предполагаемая физиологическая роль связанных с белками динитрозильных комплексов негемового железа состоит в том, что они создают в организме запас оксида азота, который используется для S-нитрозирования через промежуточное образование нмДНИС, в отличие от КОТОРОГО белковые динитрозильные комплексы железа стабильны в течение нескольких часов. На примере глутатионредуктазы показано, что S-нитрозирование является только промежуточным этапом взаимодействия фермента с нмДНИС, заканчивающимся N-нитрозированием гистидинового остатка и ингибированием ферментативной активности [25, 172, 202].

В организме образование динитрозильных комплексов железа способствует депонированию, транспортировке на значительные расстояния и транснаитрозированию NO, что снижает возможность его локального токсического воздействия на функцию и жизнеспособность клеток. При этом ДНИС конкурентно препятствуют реакции NO с ROS, в результате

которой образуются весьма токсичные RNOS. Но интоксикация, возникающая при чрезмерном синтезе оксида азота или воздействии на организм его экзогенных доноров, во многом определяется высоким сродством NO к свободному и связанному с белками негемовому железу. Она сопровождается ингибированием ферментов электронтранспортной цепи митохондрий, глутатионредуктазы и глутатион-S-трансфераз, рибонуклеотидредуктазы, ксантиноксидазы и других металлоэнзимов. Низкомолекулярные DNIC необратимо активизирует неселективные катионные каналы в клеточной мембране, усиливают высвобождение норадреналина из стенки артерии и участвуют в механизме вазодилатации, что также во многом определяет токсичность NO [129].

Свойства пероксинитрита (ONOO^-) и радикал диоксида азота ($\bullet\text{NO}_2$)

Наиболее токсичным соединением среди реактивных форм оксидов азота является пероксинитрит. К счастью, природа позаботилась о том, чтобы его разрушительное действие сводилось к минимуму, и чтобы в физиологических условиях проявлялось его регуляторное и цитопротекторное действие. ONOO^- неизбежно образуется в клетках и тканях всюду, где одновременно встречаются NO и супероксид (O_2^-), что обусловлено очень высокой скоростью их взаимодействия: около $2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Высокое сродство NO к O_2^- ограничивает его прямое действие и определяет разнообразные токсические проявления, опосредованные образованием RNOS. Особенно благоприятные условия для синтеза ONOO^- создаются в клеточных компартментах с высокой активностью NOS и таких ферментов, ответственных за образование O_2^- , как ксантиноксидаза, NAD(P)H-оксидоредуктаза, циклооксигеназа, липоксигеназа и цитохром P-450, а также в процессе функционирования электронтранспортной цепи митохондрий и аутоокисления некоторых метаболитов. Мощным источником O_2^- являются активированные макрофаги и нейтрофилы [200].

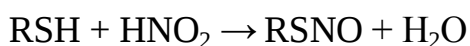
К основным составляющим системы антиоксидантной защиты относятся СОД, в частности ее митохондриальная и цитоплазматическая изоформы (Mn-СОД и Cu-Zn-СОД), каталаза, глутатион и мочевая кислота. В норме в клетках и тканях организма концентрация СОД на два порядка превышает концентрации NO. Это создает препятствие для образования ONOO⁻, несмотря на то, что возможность контакта O₂⁻ с ферментом меньше, чем с NO (из-за ограниченности его диффузии между клеточными компартментами), а указанная скорость синтеза ONOO⁻ значительно выше, чем скорость устранения O₂⁻ в супероксиддисмутазной реакции ($2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$). Интересно, что СОД в присутствии высоких концентраций H₂O₂ и NO может образовывать ONOO⁻. Последний также способен ингибировать Cu-Zn-СОД и Mn-СОД через нитрование ее 34-го тирозинового остатка [141]. В физиологических условиях антиоксидантная система справляется с устранением подавляющего количества синтезируемого O₂⁻. Только небольшая часть NO расходуется на синтез RNOS, а остальная локально, в пределах диффузии, вступает в прямое взаимодействие с теми или иными биологическими мишенями [154]. Пероксинитрит может восстанавливаться в NO с помощью нитритредуктаз (митохондриальной и локализующейся в эндоплазматическом ретикулуме изоформ). В этом процессе участвуют NADH или NADPH и флавопротеины. В результате нитритредуктазных реакций не только снижается концентрация токсичного RNOS, но и удлиняется так называемое время жизни NO.

Пероксинитрит - довольно стабильное соединение (его кристаллы могут храниться годами без существенного разложения), способен диффундировать на значительные расстояния в клетках и преодолевать клеточные мембраны. Однако в водной среде при окислении он протонируется и быстро разрушается с образованием около 70% аниона нитрата и 30% радикалов (гидроксильного и диоксида азота), которые во многом и обуславливают его окислительные и нитрующие свойства: $\text{O}_2^- + \bullet\text{NO} \rightarrow \text{ONOO}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{HOONO} \rightarrow \text{NO}_3^- + \text{H}^+ + \text{OH}\bullet + \bullet\text{NO}_2$. Поэтому

токсические эффекты ONOO^- особенно выражены в организме в условиях ацидоза, в ишемизированных тканях, в фагосомах активированных фагоцитарных клеток. Токсическое действие ONOO^- зависит от концентрации. При низких концентрациях проявляются его регуляторные и протекторные свойства в отношении функции ферментных систем и выживаемости клеток. Установлено его участие и в процессах сигнальной трансдукции. Поэтому образование ONOO^- может отчасти нейтрализовать прямое токсическое действие $\bullet\text{NO}$ или O_2^- [12, 47].

Окислительные и нитрирующие свойства пероксинитрита в организме распространяются на многие биомолекулы, включая различные низкомолекулярные метаболиты, белки, нуклеиновые кислоты и липиды. Основными мишенями его действия являются тиолы, CO_2 и металлопротеины.

В реакции ONOO^- с тиолами при физиологическом значении pH в клетках и тканях образуется около 1-2% S-нитрозотиолов (RSNO). Их выход увеличивается в присутствии аскорбиновой кислоты. В основе реакции лежит прямой нуклеофильный нитрозирующий механизм с высвобождением HOO^- : $\text{RS}^- + \text{ONOOH} \rightarrow \text{RSNO} + \text{HOO}^-$. В клетках возможно также локальное образование RSNO в местах с кислым pH и высокими концентрациями тиолов, в частности глутатиона и цистеина. В этих условиях реакция протонированного ONOO^- с тиолами приводит к их окислению в дисульфиды и образованию азотистой кислоты, которая нитрозирует часть тиолов:



С образованием S-нитрозотиолов в значительной мере связывают регуляторное и цитопротекторное действие низких концентраций ONOO^- .

Двуокись углерода успешно конкурирует за пероксинитрит с тиолами и металлопротеинами в физиологических условиях, когда он протонируется и разрушается очень медленно. Это обусловлено высокой концентрацией CO_2 в тканях. Взаимодействие CO_2 и ONOO^- образует нитрозопероксикарбонатный анион (ONOOCO^-). Этот анион по отношению к ряду белков является более мощным нитрирующим агентом, чем ONOO^- , но будучи короткоживущим интермедиатом быстро распадается с образованием 65% аниона нитрата, а также 35% весьма реактивных радикалов диоксида азота ($\bullet\text{NO}_2$) и карбонатного аниона ($\text{CO}_3^{\bullet-}$) [50, 143]. $\bullet\text{NO}_2$ могут также образовываться в реакции NO с молекулярным кислородом при их высоких концентрациях в гидрофобном окружении (в мембранах и белках), способствующем высокой растворимости исходных реагентов. Но эта реакция аутоокисления NO, очевидно, вносит небольшой вклад в синтез $\bullet\text{NO}_2$, поскольку в дальнейшем приводит к образованию N_2O_3 – молекулы, наиболее ответственной за процессы образования S- и N-нитрозосоединений [52]. *In vivo*, по-видимому, более выражен путь образования $\bullet\text{NO}_2$ из нитританиона вследствие одноэлектронного окисления с участием железа, находящегося в тех или иных комплексах в виде оксоформы (Fe^{4+}). $\bullet\text{NO}_2$ образуются при воспалительных процессах с участием лейкоцитарных гемпероксидаз (миелопероксидазы, эозинофильной пероксидазы), а также H_2O_2 и $\bullet\text{OH}$. Источником нитрита в организме помимо алиментарного фактора может быть NO, который окисляется окси- или метгемоглобином и ONOO^- .

Являясь окисленными радикалами, $\bullet\text{NO}_2$ и $\text{CO}_3^{\bullet-}$ не образуют супероксидный анион в реакции с кислородом. Отсутствие заряда позволяет $\bullet\text{NO}_2$ вступать в реакции пероксидации и нитрирования липидов, а также окисления аминокислот, преимущественно цистеина, триптофана и особенно тирозина в гидрофобном окружении клеточных мембран и белковых доменов. Наличие заряда в $\text{CO}_3^{\bullet-}$ ограничивает его действие в водной среде, где этот анионный радикал легко окисляет глутатион,

аминокислотные остатки белков и гуаниновое основание нуклеозидов, нуклеотидов и нуклеиновых кислот. Одновременное образование $\bullet\text{NO}_2$ и $\text{CO}_3^{\bullet-}$ создает условие для их комбинированного, воздействия на мишени через нитрирование и окисление, вследствие которого возможно синергическое усиление их повреждающего действия [50, 57].

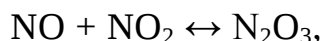
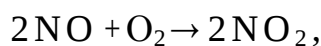
Важным звеном в реализации токсического действия ONOO^- в организме является нитрирование тирозина (свободного и в составе белков) с образованием 3-нитротирозина. Существует высокая корреляция между интенсивностью образования ONOO^- и 3-нитротирозина. Учитывая, что ONOO^- *in vivo* не обнаруживается, то уровень 3-нитротирозина, определяемый аналитическими и иммунохимическими методами в клетках и тканях, рассматривают как биомаркер, отражающий интенсивность образования ONOO^- . Но это не совсем корректно, поскольку образование свободного и связанного с белками нитротирозина скорее всего отражает действие и других RNOS. Возрастание уровня 3-нитротирозина наблюдается при хронических воспалениях, атеросклерозе, нейродегенеративных процессах, сердечно-сосудистых и острых легочных поражениях, цитотоксическом действии ксенобиотиков [120].

Вызванное пероксинитритом нитрирование тирозина с участием гемпероксидаз происходит благодаря образованию радикалов $\bullet\text{NO}_2$ и тирозина. Образование последнего ускоряется $\text{CO}_3^{\bullet-}$ и металлами, находящимися в комплексах в виде оксоформы, и, в меньшей мере, $\bullet\text{OH}$. Нитрирование тирозина помимо этого свободнорадикального пути может осуществляться посредством электрофильного механизма с участием переходных металлов. Характерным примером может служить цитоплазматическая Cu- и Zn-зависимая супероксиддисмутаза (СОД1). Интересно, что у 25% больных, страдающих семейным боковым амиотрофическим склерозом (СБАС), обнаруживается мутация гена СОД1, кодирующего Cu- и Zn-СОД, с возникновением которой связывают развитие указанной патологии. Отсутствие корреляции между дисмутазной

активностью и частотой возникновения или тяжестью болезни, установленной в экспериментах и при использовании трансдукции мутантных генов СОД1 в клетки, указывает на то, что мутированная форма СОД1 приобретает новые, не выраженные в норме функции. Обнаруженное повышенное содержание нитротирозина в белках двигательных нейронов больных СБАС дает основание предположить, что в связи с мутацией в активном центре СОД1 Cu^{2+} восстанавливается в Cu^+ . В связи с этим фермент приобретает способность реагировать с ONOO^- , вследствие чего образуются ионы нитрония (NO_2^+), которые через нитрирование белков инициируют нейродегенеративные процессы.

Согласно другой гипотезе, восстановление Cu^{2+} в Cu^+ в мутантной СОД1, обусловленное снижением сродства к Zn^{2+} , позволяет ферменту осуществлять обратный катализ, в котором из кислорода синтезируется $\text{O}_2^{\bullet-}$. В реакции с NO последний образует ONOO^- , индуцирующий нитрирование тирозина. Однако все больше экспериментальных доказательств получает гипотеза, по которой мутированная СОД проявляет пероксидазные свойства и катализирует превращение H_2O_2 в $\bullet\text{OH}$, повреждающий нейроны у больных СБАС. ONOO^- через нитрирование способен снижать активность Cu-, Zn- и Mn-СОД. Мишенью нитрирования Mn-СОД служит тирозиновый остаток 34 [60, 63].

N_2O_3 образуется в организме в результате аутооксидации NO в присутствии молекулярного кислорода:



Благодаря своей гидрофобности, NO и O_2 могут накапливаться в липидном слое мембран или внутри белков в очень высоких концентрациях, способных ускорить эту реакцию в тысячи раз. N_2O_3 , являясь источником

катиона нитрозония (как показано выше), обладает сильной способностью к нитрозированию.

Взаимодействуя с первичными и вторичными алифатическими и ароматическими аминами, N_2O_3 легко образует N-нитрозоамины. Они представляют канцерогенную и мутагенную опасность: в результате биотрансформации цитохромом P-450 они деметилируются с образованием иона диазония и формальдегида, которые могут алкилировать ДНК, взаимодействуя с азотом, гидроксильными или карбонильными группами оснований и фосфатными группами. Кроме того, эти интермедиаты N-нитрозоаминов могут осуществлять нитрозативное дезаминирование пуринов и пиримидинов. Алкилирование и дезаминирование ДНК вызывает в ней одно- и двуцепочечные разрывы, что вызывает переходные и перекрестные мутации. Ситуация осложняется еще и тем, что функция некоторых белков, осуществляющих репарацию дезоксирибонуклеиновой кислоты, угнетается N_2O_3 . N-нитрозоамины также подвергаются денитрозированию цитохромом P-450 [64, 121, 161].

N_2O_3 с SH-группами цистеина и цистеиновых остатков образует тионитритные эфиры – S-нитрозотиолы (RSNO), тогда как при взаимодействии тиолов непосредственно с NO они окисляются в дисульфидную форму. Помимо цистеина, основными представителями низкомолекулярных S-нитрозотиолов (nmRSNO) в организме являются S-нитрозоглутатион (GSNO) и S-нитрозогомоцистеин (HcySNO). Внутриклеточные концентрации глутатиона (ммолярные) намного выше, чем у других низкомолекулярных SH-содержащих лигандов, и поэтому он является преимущественной мишенью для S-нитрозирования. Значительно большая по сравнению с S-нитрозоцистеином (CysSNO) и HcySNO стабильность GSNO обеспечивает ему основную роль в депонировании NO и его транспортировке к сенсорным мишеням. Направленность физиологических эффектов nmRSNO и NO в отношении тонуса сосудов, нейромедиации, агрегации тромбоцитов, иммуномодуляции и других

процессов во многом схожа и связана со способностью нМРСНО высвобождать NO. Но биоактивность нМРСНО имеет и существенные особенности, что определяются их стабильностью и другими свойствами, обусловленными функциональной группой $-S-N=O$. Так, показана возможность участия CysSNO (но не NO) в передаче сигналов между кардиоваскулярными нейронами в ядре отдельного тракта (NTS) через связывание с соответствующими рецепторами [65, 209].

В механизме транспорта нМРСНО в клетки многое еще не ясно. Согласно некоторым предположениям в нем участвуют эктоферменты клеточной мембраны, в частности, дисульфидизомераза белков и γ -глутамилтранспептидаза. Первая осуществляет денитрозирование нМРСНО, что вызывает накопление в гидрофобной части мембраны NO и последующее его окисление в N_2O_3 , который затем нитрозирует тиолы, находящиеся в цитозоле возле внутренней поверхности плазматической мембраны. Вторая превращает внеклеточный GSNO в S-нитрозоцистеинилглицин. Высвобождаемый из него NO участвует в нитрозировании внутриклеточных тиолов как указано выше. Цистин аминокислотным транспортером переносится в клетку, где восстанавливается в цистеин, который, высвободившись из клетки и реагируя с GSNO, образует CysNO. Последний через другую транспортирующую аминокислоты систему (L-AT) проникает в клетку, где участвует в транснаитрозировании глутатиона и других низко- и высокомолекулярных SH-содержащих мишеней. Таково первое экспериментальное обоснование механизма переноса S-нитрозосоединений в клетки (а возможно и из них) без сопутствующего высвобождения NO. Способность различных типов клеток транспортировать нМРСНО неодинакова. Те из них, у которых она слабая, могут, очевидно, более успешно противостоять нитрозативному стрессу, обусловленному индукцией iNOS в соответствующих клетках при воспалительных и других процессах [68].

Декомпозиция hMRSNO *in vivo*, осуществляемая различными механизмами при участии свободных тиолов, железа, аскорбиновой кислоты, кислорода и супероксида, приводит к образованию различных метаболитов, включая NO , N_2O , NO_2^- , NH_4^+ , NH_2OH , дисульфиды, сульфинамиды, сульфиновые и сульфоновые кислоты. Перенос NO^+ от более стабильных S-нитрозотиолов (GSNO , S-нитрозопротеинов) к менее стабильным (S-нитрозоцистеину, S-нитрозоцистеинилглицину) облегчает дальнейшее высвобождение из них NO . Его высвобождение с образованием соответствующих дисульфидов существенно ускоряют ионы Cu^+ , наличие которых обеспечивает восстановление Cu^{2+} анионами свободных тиолов (RS^-). Возможно, что взаимодействие hMRSNO с ионами железа приводит к образованию динитрозильных комплексов, которые служат источником NO . Тот факт, что фотохимическое и термическое воздействия на hMRSNO расщепляют их на NO и дисульфиды, открывает новые возможности в фото- или термохимиотерапии онкологических заболеваний. С этой целью hMRSNO вводят в организм в составе липосом или нетоксичных гелей, которые обеспечивают их доставку к местам локализации опухолевых клеток. Там под воздействием лазерного облучения или повышенной температуры происходит расщепление hMRSNO с высвобождением цитотоксичных концентраций оксида азота. Декомпозиция S-нитрозотиолов ускоряется O_2^- и может закончиться образованием пероксинитрита [70, 145, 186].

Перенос NO^+ от S-нитрозотиолов к другим эндогенным тиолам (S-транснаитрозирование) является основным механизмом, который позволяет вовлечь в нитрозирование различные содержащие тиолы молекулы (находящиеся в клетках, на их поверхности и во внеклеточном пространстве), что способствует метаболической коммуникации и разнообразит биологическое действие NO в организме. Реакция S-транснаитрозирования подобно реакциям фосфорилирования или ацетилирования осуществляет обратимую посттрансляционную

модификацию белков. При этом нуклеофильной атаке подвергаются реакционно-способные SH-группы цистеина, которые тесно связывают цинк, железо и коферменты с белками, а также структура и функция ферментов, ионных каналов, G-белков, факторов транскрипции, работа механизмов транспорта электронов и формирование сигнальной трансдукции. Из многих реактогенных SH-групп белков S-транснаитрозированию подвергаются только некоторые, локализирующиеся в участках с определенной первичной структурой вблизи NOS-синтаз и низкомолекулярных тиолов, при соответствующем редокс-состоянии клеток [75].

В кровяном русле реакции S-транснаитрозирования участвуют в регуляции тонуса и пролиферации клеток сосудов, скорости агрегации тромбоцитов и лейкоцитарной адгезии, а также в осуществлении паракринной и эндокринной функций NO. Последнюю связывают с образованием S-нитрозоальбумина (AlbSNO) и S-нитрозогемоглобина (HbSNO), которые могут переносить NO током крови на большие расстояния [9]. В гидрофобных участках альбумина создаются условия для мицелярного аутоокисления NO в N_2O_3 , который расходуется на S-нитрозирование собственных Cys-34- и Trp-214-остатков и низкомолекулярных тиолов плазмы крови. В образовании AlbSNO через S-транснаитрозирование могут участвовать CySNO, GSNO, S-нитрозо- α -липоевая кислота, HcySNO и другие nMRSNO [77].

Сывороточный альбумин в присутствии низкомолекулярных тиолов значительно усиливает гипотензивное и ингибирующее агрегацию тромбоцитов действие NO, что обусловливается образованием AlbSNO [10, 111]. Возможно, оно усиливается под влиянием аскорбата и церулоплазмينا. Исследование на тромбоцитах и мегакариоцитах показало, что физиологическая активность GSNO и AlbSNO опосредуется реакциями S-транснаитрозирования с тиолами, расположенными на поверхности плазматической мембраны [177].

Известно, что NO может реагировать с β -93-цистеином гемоглобина,

образуя HbSNO. Предполагается, что HbSNO образуется в условиях высокого парциального давления O_2 в легких, откуда кровотоком доставляется к гипоксичным тканям, где высвобождает NO, способствуя тем самым расширению капилляров, а также доставке эритроцитов и O_2 во все участки ткани. Аргументом в пользу этой гипотезы считалось наличие высокой концентрации HbSNO в эритроцитах артериальной крови (2,5 мкМ) и значительного артериовенозного концентрационного градиента по этому показателю. Однако в настоящее время роль S-нитрозирования альбумина и гемоглобина в обеспечении эндокринной функции NO подвергается серьезным сомнениям. С помощью новых чувствительных методов определения S-нитрозотиолов, учитывающих их высокую лабильность, показано крайне низкое содержание AlbSNO в плазме крови (около 5 нмоль/л), которое к тому же существенно не изменяется при ингаляционном введении в организм оксида азота. Причина такой низкой концентрации не ясна. Уровни HbSNO в эритроцитах не превышают 40 нмоль/л и имеют сходные величины в крови артерий и вен. Низкое содержание HbSNO в эритроцитах объясняется тем, что возможность контакта гемоглобина с NO, синтезируемого эндотелиальными клетками, уменьшена на три и более порядков вследствие барьера, который создается эритроцитарной мембраной и обтекающим ее потоком плазмы. При проникновении в эритроциты NO может перехватываться гемовым железом и, в зависимости от степени оксигенации гемоглобина, либо окисляться в нитрат, либо связываться в железо-нитрозильном комплексе. Поэтому можно считать, что NO, синтезируемый эндотелиальной NOS, в физиологических условиях влияет на тонус сосудов главным образом в паракринной манере [81, 203].

При повышении уровня NO (ингаляция оксидов азота, введение доноров NO, активаторов NO-синтаз, индукция эндогенного синтеза NO при воспалительных и септических процессах и других патологиях) в крови, помимо увеличения концентраций AlbSNO и HbSNO, возрастает также уровень HbFe-NO, нMRSNO, N-нитрозоаминов, нитротирозина (в белках)

и нитрита. Концентрации нитрита в организме так же, как и нитратредуктазная активность тканей (существенный вклад в нее вносят гемовые белки и ксантиноксидоредуктаза) и эритроцитов, значительно возрастают при гипоксии. В этих условиях роль нитрита в генерации NO, необходимого для улучшения кровоснабжения тканей, представляется исключительно важной [86].

В организме находят все больше мишеней, подвергаемых S-нитрозированию. Среди них следует отметить кальциевые каналы, активаторы плазминогена и транскрипции, различные рецепторы, G-белки (включая H-gas) и ферменты: креатинкиназы, ароматазы, алкилтрансферазы, глицероальдегид-3-фосфатдегидрогеназы, протеазы, протеинкиназы, фосфатазы и др.

Нитрозативный и оксидативный стрессы в организме зачастую обнаруживаются одновременно. При этом S-нитрозирование белков сочетается с их S-тиолированием – образованием дисульфидных связей между SH-группами цистеиновых остатков белков и SH-группами CysSH или GSH. В условиях оксидативного стресса основными субстратами S-тиолирования белков служат их окисленные интермедиаты (белок-S• и белок-SOH), а также CysSH и GSH. Истощение клеточного фонда GSH вызывает окисление белков и их необратимое повреждение. GSNO и его окисленные производные при добавлении к клеткам могут S-тиолировать белки и образовывать низкомолекулярные дисульфиды. Наибольшую реактогенность при этом проявляет глутатиондисульфид-S-оксид (GS(O)SG). Некоторые белки в той или иной мере подвергаются как S-нитрозированию, так и S-тиолированию. В стимулированных нейтрофилах и макрофагах усиливается S-тиолирование актина и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы. При ишемии и реперфузии резко возрастает количество S-тиолированных белков - рецептора LDL, АТФ-синтазы, белка теплового шока, оксикислотной оксидазы, триозофосфат-изомеразы и др. При воздействии GSNO на цистеиновые протеазы образуются смешанные и

межмолекулярные дисульфиды, что снижает их активность. S-тиолирование белков обратимо под влиянием восстанавливающих агентов. Поэтому можно полагать, что эта реакция подобно S-нитрозированию, может либо разнообразить сигнальные и метаболические функции белков, либо нарушать их и, тем самым, вносить существенный вклад в цитотоксическое действие NO [204].

Физиологические свойства оксида азота в биологии и клинике

Оксид азота относится к эндогенным регуляторам клеточных функций с широким спектром действия. Он может быть переносчиком сигнала, регулятором метаболизма, а также токсичным агентом.

Биологический эффект NO разнонаправлен и изменяется в зависимости от конкретной физиологической ситуации. Эффекторное действие молекулы зависит не только от ее индивидуальных химических свойств, но и от цитозольного окружения, активности других ферментных систем и, наконец, от общего уровня метаболизма клетки [153].

Функциональная активность NO и его метаболитов реализуется либо опосредованно через cGMP, либо непосредственно при взаимодействии с физиологически важными молекулами. В первую очередь следует выделить роль NO в клетке в качестве мессенджера, прямым образом связанную с регуляцией им ионного гомеостаза.

Показано, что NO усиливает синтез cGMP путем активации рГЦ. В дальнейшем cGMP способна модулировать работу cGMP-зависимых Ca^{2+} -каналов ПМ, угнетая или активизируя G-киназы (cGMP-зависимые протеинкиназы) [15, 122], что приводит, например, к фосфорилированию фосфоламбана — белка, регулирующего активность Ca^{2+} -насоса эндоплазматического ретикулума, и усилению депонирования Ca^{2+} в последнем. В тромбоцитах человека также показано NO/cGMP-зависимое

ингибирование фосфолипазы C и, возможно, непосредственное фосфорилирование рецептора инозитол-3-фосфата, вызывая его десенсибилизацию. Кроме того, G-киназы активируют протеинфосфатазу, дефосфорилирующую K^+ -каналы и активизирующую их. Описанные процессы направлены на снижение уровня свободного Ca^{2+} в цитоплазме клеток.

Одновременно показано активизирующее действие NO через cGMP-зависимые механизмы на фермент cADP-рибозилтрансферазу. Образование cADP-рибозы – агониста рианодиновых рецепторов усиливает выход Ca^{2+} из ЭР. Таким образом, оксид азота cGMP-зависимым путем может снижать или повышать концентрацию свободного Ca^{2+} в цитозоле [6]. Одним из объяснений этого феномена может быть органоспецифичность, в частности, связанная с неодинаковым развитием ЭР и ПМ в разных клетках, а также особенности внутриклеточного метаболизма [42]. Можно также предположить, что сложное и неоднозначное действие NO обеспечивает тонкую необходимую регуляцию уровня цитозольного Ca^{2+} во времени и пространстве для выполнения клеточных функций.

Исходя из высокой реакционной способности NO, допускается возможность прямой модификации им (или его производными) канальных структур ПМ. Так, показана активизация эндогенным NO K_{Ca} -каналов сосудистой гладкомышечной клетки (ГМК), вероятно, посредством окисления тиоловых групп. С другой стороны, деполяризация изолированных нервных окончаний мозга донаторами NO развивается из-за уменьшения калиевой проводимости и ингибирования натриевого насоса, что также связывают с окислением SH-групп. Показано ингибирование NO-донаторами АТР-чувствительных калиевых каналов в клетках поджелудочной железы, неселективных катионных каналов жировой ткани, а также сопряженных с NMDA-рецептором каналов в нервной ткани.

Данные о влиянии NO на Ca^{2+} каналы ПМ различных тканей также противоречивы. Показано, что донатор NO – нитропруссид натрия (100 мкМ)

– подавляет транзистентную и стационарную компоненты высокопорогового кальциевого тока в нейронах целиарного ганглия. Практически тот же эффект вызывает L-аргинин, что устраняется блокаторами NOS. В ГМК артерий мозга потенциалзависимые кальциевые каналы ПМ блокируются 10 мкМ нитропруссидом натрия в 2,6 раза эффективнее, чем аргинином. Однако при этом усиливаются K_{Ca} -токи, что вызывает гиперполяризацию ПМ. Оба эффекта воспроизводятся под влиянием 8-Br-cGMP (негидролизующим аналогом cGMP) [Nitric oxide <http://www.whatislife.com/reader2/Metabolism/pathway/Nohtml.>].

Но опубликована и масса противоположных данных. Показано, что в нейронах коры NO индуцирует вход Ca^{2+} через L- и P- каналы в ответ на деполяризацию ПМ и ингибирует N-каналы. Нитропруссид натрия и SNAP (органический NO-донатор) в концентрации 500 мкМ увеличивают амплитуду Ca^{2+} -тока в нейронах шейного ганглия. В меньшей концентрации (100-200 мкМ) они снижают K^{+} -проводимость, а в низкой (10 мкМ) – активизируют каналы. В результате сделан вывод, что блокирующий эффект NO на K^{+} -проводимость связан с образованием пероксинитрита.

Вероятно, значительную роль в описанных эффектах играет концентрация NO, что обуславливает *in vivo* модуляцию ионного гомеостаза разными АКМ – производными NO.

Оксид азота регулирует ионный гомеостаз также посредством модуляции активности G-белков. Продемонстрирована NO-зависимая активизация пертуссинчувствительных G-белков и p21ras [91].

В зависимости от концентрации NO действует в организме либо как медиатор, контролирующий биохимические реакции и функции различных органов и систем (в физиологических концентрациях), либо как токсический агент (при повышенных концентрациях). При этом цитотоксический или цитопротекторный эффекты зависят от суммарного действия многих внешних стимулов и статуса клеток. Наиболее распространенным в физиологических условиях проявлением цитотоксического действия является апоптоз [187].

Эффект оксида азота на сосудистый тонус был впервые продемонстрирован более 20 лет назад и с тех пор довольно хорошо изучен. Оксид азота, вырабатываемый эндотелием, обеспечивает расслабление гладких миоцитов и последующую вазодилатацию. Фармакологическое ингибирование данного процесса повышает тонус сосудов, что убедительно демонстрирует роль недостатка этого соединения в генезе эссенциальной гипертензии, ИБС, цереброваскулярных заболеваний и их осложнений.

NO является одним из наиболее мощных вазодилататоров. Проникая из ЭК в гладкомышечные клетки сосудистой стенки, он активизирует растворимую гуанилатциклазу, что, соответственно, повышает уровень цГМФ, активизирует цГМФ-зависимые протеинкиназы (PKG), снижает концентрацию кальция, расслабляет сосуды [176]. Вследствие этих изменений снижается тонус артериальных и в большей степени венозных сосудов по малому и большому кругу кровообращения, уменьшается пред- и постнагрузка на сердце, а также давление наполнения желудочков. Следует заметить, что коронародилатирующее действие направлено в основном на мелкие артерии венечного бассейна, особенно на стенозированные его участки, патологически измененные атеросклеротическим процессом, при этом отсутствует синдром обкрадывания. Кроме того, оксид азота способен стимулировать либерацию эндотелиального простациклина и угнетать синтез тромбосана A_2 , что потенцирует вазодилатацию.

Кроме того, NO опосредует сосудорасширяющие эффекты эндотелийзависимых вазодилататоров (ацетилхолина, брадикинина, гистамина и др.), тормозит образование эндотелиального сосудосуживающего фактора эндотелина-1 и высвобождение норадреналина окончаниями симпатических нейронов, препятствует осуществлению чрезмерных эффектов других вазоконстрикторов (ангиотензина, тромбосана A_2). Благодаря этому он активно участвует в регуляции сосудистого тонуса и кровотока (в том числе базального), уровня АД, системной и региональной гемодинамики.

NO стимулирует синтез эндотелиального фактора роста, но тормозит пролиферацию и миграцию [61] гладкомышечных клеток (тем самым препятствуя образованию неоинтимы) и гипертрофию сосудов, уменьшает (в небольших концентрациях) или увеличивает (в больших концентрациях) апоптоз, подавляет синтез внеклеточного матрикса, поддерживая всем этим нормальную структуру сосудистой стенки.

Оксид азота дозозависимо тормозит пролиферацию гладких миоцитов, которая наблюдается при прогрессировании атеросклеротических изменений, замедляя, таким образом, сужение просвета сосудов, улучшая коронарную гемодинамику и кровоток в венозном русле. Он способен стимулировать ангиогенез, что потенциально важно при ишемии миокарда и мозговых катастрофах.

Оксид азота оказывает мощное противовоспалительное и антитромбогенное действие: тормозит транскрипцию противовоспалительного ядерного фактора (NF-κB) [117], блокирует стимулируемую цитокинами экспрессию адгезивных молекул эндотелия (VCAM-1, E-селектин, MCP) и хемотаксические пептиды моноцитов, уменьшает прилипание, инфильтрацию, агрегацию нейтрофилов и моноцитов, превращение последних в макрофаги, тормозит агрегацию и адгезию тромбоцитов, экспрессию активизирующего тромбоциты фактора, рост формирующегося тромба. Ингибирование NO-синтазы у здоровых добровольцев достоверно увеличивает время свертывания крови и ухудшает другие показатели коагулограммы.

В состав сосудистой стенки входит холестерин, обладающий изолирующими свойствами. Вместе с тем, липиды хорошо растворяют реакционно-способные молекулы NO и защищают их от гидрофильных соединений. Поэтому весьма возможно образование спиральных полимерных NO-молекул в холестериневом матриксе. Отдельные нити этих молекул могут встраиваться между витками спиральной структуры и, за счет взаимодействия между нитями, стабилизировать общую структуру. Такое

взаимодействие между нитями будет увеличивать проводимость общей спиральной структуры.

Кроме простой спирали линейные NO-молекулы могут образовывать суперспиральные структуры. При прохождении тока по спиральной или суперспиральной структуре возникает магнитное поле, направленное вдоль оси спирали и радиально появляются силы, стремящиеся раздвинуть диаметр токопроводящих нитей. При наличии управляющих импульсов в сосудистой стенке диаметр сосуда увеличивается и таким образом окись азота влияет на сосудистый тонус. Холестерин, как известно, в результате окисления превращается в так называемый «плохой» холестерин, способствующий образованию бляшек и закупорке сосудов. Весьма вероятно, что окисленные формы холестерина могут нарушать проводимость спиральной структуры и в этом месте регулирующее воздействие магнитного поля на просвет сосуда уменьшается.

Взаимодействие оксида азота с ЛПНП и ЛПВП

Исследования убедительно показали, что окисленные ЛПНП тормозят высвобождение NO ЭК и уменьшают тем самым эндотелийзависимую вазодилатацию. Полагают, что это может быть связано с нарушениями в передаче сигналов на уровне мембран, подавлением образования NO и увеличением скорости его инактивации [206].

Аналогичные данные были получены на клетках крови, тесно взаимодействующих с эндотелием сосудов, в том числе на тромбоцитах, которые обладают специфическими рецепторами для липопротеидов низкой плотности (ЛПНП), а также eNOS-подобной (конститутивной) NOS. Кроме того, окисленные ЛПНП могут поглощаться тромбоцитами и рецепторнезависимым механизмом. Исследования *in vitro* и *in vivo* показали, что окисленные ЛПНП подавляют синтез NO в тромбоцитах, стимулируют их агрегацию, образование тромбосана A_2 и серотонина. Активированные же тромбоциты секретируют белковый фактор, который увеличивает

поглощение окисленных ЛПНП макрофагами. Следовательно, тромбоциты функционируют в тесной связи с макрофагами.

Следует отметить, что некоторые цитокины (TNF- α и интерлейкин-1 β) тормозят экспрессию NOS мРНК. Оба они найдены в местах атеросклеротических поражений сосудов. Поскольку ЭК продуцируют интерлейкин-1, можно полагать, что трансляционная индукция этих цитокинов под влиянием окисленных ЛПНП опосредует их действие на eNOS мРНК.

Одним из важных механизмов снижения уровня NO и дисфункции сосудистого эндотелия, вызываемых ЛПНП, является нарушение ими сопряжения L-аргинина и eNOS; создание условий, препятствующих реакции окисления eNOS L-аргинина [61]. Главным здесь является нарушение ЛПНП метаболизма и транспорта L-аргинина, в результате чего его концентрация в ЭК резко падает. В этих условиях экспрессия и активность eNOS не снижаются, но возникают существенные сдвиги в их редокс/окислительных участках. Оставаясь способной получать электроны от NADPH, она поставляет их другому ее субстрату – молекулярному кислороду (O₂), что ведет к образованию супероксид-аниона (O₂⁻). При этом количество синтезированного NO резко снижается. Нормализация уровня L-аргинина в ЭК восстанавливает способность eNOS синтезировать NO даже в случаях полной потери этой способности. Одновременно тормозится образование супероксида.

О роли eNOS в образовании супероксид-аниона под влиянием ЛПНП свидетельствует тот факт, что конкурентный ингибитор eNOS L-NAME тормозит этот процесс. Данное соединение связывается с активными участками eNOS и препятствует потоку электронов (путем уменьшения восстановительного потенциала железа гема), подавляя, тем самым, активность eNOS [124].

Увеличивая синтез супероксида, ЛПНП нарушают физиологическое равновесие NO/O₂⁻ в пользу второго. Супероксид-анион вступает при этом в

быструю реакцию с NO, что ведет к образованию пероксинитрита (ONOO⁻), крайне неблагоприятно действующего на ЭК [6]. Он разлагается с образованием гидроксильных радикалов (OH⁻), которые окисляют ЛПНП. Пероксинитрит окисляет также тетрагидробиоптерин (ключевой кофактор для NOS), угнетая продукцию NO. Возникающий оксидативный стресс, активизирует большое количество оксидантчувствительных факторов транскрипции (таких как NF-κB), которые повышают экспрессию адгезивных молекул, различного рода факторов роста и хемокинов, способствующих развитию воспалительных и других процессов, возникающих при атеросклерозе. Показано также, что экспрессия iNOS сопровождается увеличением концентрации пероксинитрита, усилением апоптоза клеток атеросклеротических бляшек коронарных артерий.

Таким образом, ЛПНП негативно влияют на различные звенья системы L-аргинин-NO-eNOS в ЭК, подавляя образование NO, что опосредованно вызывает дисфункцию эндотелия и нарушение структуры сосудов, и, соответственно, развитие атеросклероза.

Снижение концентрации липопротеидов высокой плотности (ЛПВП) вызывает окисление липидов и дисфункцию эндотелия. В этой связи необходимо отметить, что α-токоферол – главная антиоксидантная составляющая витамина E – связан, главным образом, с липопротеинами плазмы крови. Его инкорпорирование в сосудистой стенке препятствует развитию дисфункции эндотелия на ранней стадии атеросклероза. Показано, что переносящий плазменные фосфолипиды белок (PLTP) переносит α-токоферол из ЛПВП в ЭК и, тем самым, предотвращает дисфункцию эндотелия антиоксидантной защитой связанных с мембраной фосфолипидов и сохраняет релаксирующую функцию сосудистых ЭК. ЛПВП поддерживают нормальное функционирование эндотелия (антиатеросклеротический эффект) и, угнетая стимулирующее действие окисленных ЛПНП, повышение экспрессии адгезивных молекул ICAM-1 и VCAM-1.

В еще большей степени сохранению функций сосудистого эндотелия способствует стимуляция ЛПВП синтеза эндотелиального NO. Дело в том, что окисленные ЛПНП лишают кавеолы (специализированные Q-образные участки длиной 50-100 нм в ЭК плазматической мембраны) холестерина (ХС), что вытесняет eNOS из кавеол и нарушает процесс ее активизации, подавляя образование NO. ЛПВП, наоборот, поддерживают нормальное содержание ХС в кавеолах (способствуя поглощению его эфиров), тем самым предотвращая вызываемое окисленными ЛПНП истощение ХС в них и повышая образование NO [151].

Оксид азота так же, как и ЛПВП, способен тормозить окисление ЛПНП. В аэробных условиях NO переходит в нитрит, низкие концентрации которого (12 мМ при норме до 200 мМ) также ограничивают опосредуемое миелопероксидазой окисление ЛПВП.

Таким образом, при избытке NO, находящегося в окружении различного рода оксидантов, окисление ЛПНП тормозится (антиатеросклеротический эффект NO). Однако при значительном избытке оксидантов NO дает начало вторичным соединениям (ONOO⁻ и др.), которые увеличивают уровень окисленных липидов в мембранах и липопротеидах.

Выяснение конкретных механизмов атерогенных эффектов окисленных ЛПНП и влияние NO на этот процесс представляют не только теоретический, но и практический интерес. Успехи в данной области могут служить основой для разработки методов профилактики и лечения атеросклероза, способствующих предотвращению или торможению окислительной модификации ЛПНП на различных уровнях (клеточном, субклеточном, молекулярном) этого процесса.

Взаимодействие оксида азота с митохондриями

Различные аспекты взаимодействия оксида азота с митохондриями привлекает внимание широкого круга исследователей. Накоплен значительный

материал, показывающий, что NO непосредственно вовлекается в регуляцию энергетических функций митохондрий [151]. Обратимо связываясь с комплексами дыхательной цепи, NO и его производные подавляют дыхание органелл и снижают потребление кислорода в работающих мышцах, в частности скелетных, и миокарде. Нарушение переноса электронов комплексами дыхательной цепи, сопровождаемое экстррузией протонов из митохондриального матрикса и создающего разность потенциалов на внутренней мембране митохондрий, вызывает, помимо снижения мембранного потенциала, еще и повышенное образование свободнорадикальных и пероксидных соединений – продуктов неполного восстановления кислорода. Эти активные формы кислорода (АФК) сами по себе или связываясь с NO и другими активными формами азота, способны существенно повреждать работу дыхательной цепи, нарушать сопряженность окисления и фосфорилирования, тем самым, отрицательно влияя на способность митохондрий к образованию энергетических ресурсов клетки (АТФ).

Другой существенной причиной повышенного внимания к выяснению роли NO в регуляции митохондриальных функций является интерес к молекулярным механизмам апоптоза и некроза, в которых митохондриям отводится едва ли не центральное место. Хотя, согласно данным литературы, роль NO в реализации программы клеточной смерти – апоптоза, не однозначно негативна. Активные формы азота – NO и его производные, в частности пероксинитрит, способны окислять тиолы митохондриальных мембран, открывать митохондриальную пору и, тем самым, запускать механизмы высвобождения в цитозоль проапоптотических факторов из матрикса и межмембранного пространства [13].

Таким образом, результаты исследований последних лет указывают на недостаточно изученную роль NO как важного биологического регулятора не только процессов образования и утилизации энергии, направленных на

поддержание жизнедеятельности клетки, но также и процессов, связанных с осуществлением программы клеточной гибели.

Термин «апоптоз» был введен в 1972 г. Дж. Ф. Керром для обозначения «программируемой» гибели клеток, которая сопровождается характерными морфологическими изменениями (конденсацией ядра и цитоплазмы, разрушением хроматина, фрагментацией ДНК, образованием апоптозных телец) и связана с развитием организма, а также протекающими в нем физиологическими и некоторыми патологическими процессами [13]. Как альтернативный апоптозу рассматривается другой тип гибели клеток – некроз. С ним связывают беспорядочные необратимые процессы, которые нарушают целостность мембран, вызывают набухание цитоплазмы и митохондрий, кариорексис и кариолизис, а также утечку клеточного содержимого. Высвобождаемые из клеток лизосомные протеазы «распространяют» некротическую гибель на соседние клетки. Причиной некроза обычно являются мощные, несовместимые с жизнью воздействия физических или химических факторов, например тепла, ионизирующей радиации, детергентов и токсинов, которые повреждают мембранные структуры, ключевые ферменты и нуклеиновые кислоты. При воспалительных реакциях некротическую гибель клеток путем воздействия на клеточную мембрану способны вызвать комплемент, цитолитические антитела, киллерные лимфоциты. В отличие от некроза апоптозные клетки подвергаются фагоцитозу до наступления их лизиса.

Введение понятия апоптоза дало мощный толчок к изучению механизмов гибели клеток и выявлению их общих патофизиологических, биохимических и генетических закономерностей. Сигналами к апоптозу могут быть внешние и внутриклеточные повреждающие факторы, в частности киллерные молекулы (TNF- α , TRAIL, CD95-L), которые взаимодействуют на плазматической мембране с соответствующими «рецепторами смерти», входящими в семейство рецепторов опухолевого некротического фактора

(TNF- α), ксенобиотики, излучения, ROS, дефицит соединений роста/выживания, гипоксия и другие неблагоприятные условия.

Известны два основных сигнальных пути реализации апоптоза. Оба они активизируют каспазы (семейство цистеиновых протеиназ, расщепляющие пептидную связь белка после остатка аспарагиновой кислоты), в частности, так называемые «казнящие» формы -3, -6 и -7, с действием которых связано повреждение структуры цитоскелета, развитие межнуклеосомной фрагментации ДНК и характерных для апоптоза морфологических признаков [42]. Это происходит через протеолиз соответствующих прокаспаз; он обеспечивается инициаторными каспазами 8 и 9, активизируемые олигомеризацией и аутопротеолизом. В некоторых случаях апоптоз запускается связыванием лигандов с упомянутыми рецепторами смерти, вследствие которого различные адаптогенные белки (включая Fas-ассоциированный смертельный домен и прокаспазу 8) объединяются в сигнальный комплекс (DISC). В нем прокаспаза-8 саморасщепляется с образованием активной каспазы-8, способной путем протеолиза формировать активные каспазы-3, -6 и -7. В других случаях этого прямого каспазного каскада недостаточно, чтобы вызвать апоптоз. Для усиления сигнала вовлекаются митохондрии. При этом протеолитически активированные каспазой-8 белки семейства «BH3-only» иницируют нарушение проницаемости мембран митохондрий и выход из них цитохрома C в цитоплазму, где он в присутствии АТР объединяется с активизирующим протеазы фактором (Araf-1) в мультимерный комплекс. Последующее присоединение к нему прокаспазы-9 создает условие для ее аутопротеолиза с образованием каспазы-9, которая активизирует прокаспазы-3 и -7. В регуляции проницаемости митохондриальных мембран участвуют белки семейства Bcl-2 и белок p53, супрессирующий рост опухоли. Помимо усиления и опосредования указанных внешних проапоптогенных сигналов митохондрии играют ведущую роль в реализации апоптоза, вызванного повреждением ДНК, оксидативным стрессом,

голоданием, воздействием ксенобиотиков и другими факторами. Гибельными для клеток последствиями повреждения митохондрий являются также выход из них индуцирующего апоптоз фактора (AIF) и эндонуклеазы G, прекращение синтеза АТФ, окисление глутатиона и усиление генерации ROS [201].

В сигнальных процессах апоптоза участвует также эндоплазматический ретикулум. Нарушение внутриклеточного гомеостаза Ca^{2+} или биосинтеза белка в нем приводит к экспрессии каспазы-12 на его мембранной поверхности и транслокации к ней прокаспазы-7, что обеспечивает ее протеолитическую активизацию. Указанные сигнальные пути апоптоза между собой тесно взаимодействуют [16].

Практически все типы клеток, пребывающие в состоянии покоя или пролиферации, при воздействии пусковых повреждающих факторов невысокой надпороговой интенсивности способны гибнуть по тем или иным сценариям апоптоза, за этапами развития, которого можно проследить во времени. Гибель клеток по типу некроза вызывается повреждающими факторами запредельной интенсивности либо осмотическим шоком и детергентами. Этот процесс происходит настолько быстро, что появление характерных морфологических изменений можно отнести уже к посмертным. Фактически к апоптозу относятся все этапы, сопровождающие гибель клеток, а к некрозу только те структурно-биохимические изменения, которые происходят уже после смерти клеток.

NO может как усиливать жизнеспособность клеток, так и оказывать на них цитотоксическое действие. NO повышает выживаемость В-лимфоцитов, натуральных киллеров, эозинофилов, гепатоцитов, эмбриональных двигательных нейронов и некоторых клеточных линий, в условиях, способствующих их гибели. Цитотоксическое действие NO даже в его относительно низких концентрациях показано на макрофагах, тимоцитах, фибробластах, кардиомиоцитах, хондриоцитах, нейронах, опухолевых, гладкомышечных, островковых панкреатических и

эндотелиальных клетках [55]. NO защищает астроциты, но синергически усиливает гибель нейрональных клеток при токсическом воздействии стауроспорина [19]. Доноры NO в таких же концентрациях вызывают гибель макрофагов и способствуют выживаемости клеток, что связывают с более высоким содержанием в последних негемового железа. Таким образом, направленность действия NO связана с «судьбой» его химических превращений в различных типах клеток, которая определяется особенностями их обмена, в частности железа, O_2 , CO_2 и редокс-состояния в норме и при патологии.

Механизмы цитопротекторного действия NO включают ингибирование активности каспаз через S-нитрозирование цистеиновых остатков их каталитических центров [187]. Эффективность S-нитрозирования в нормальных условиях определяет внутриклеточный уровень негемового железа (Fe^{2+}), которое, взаимодействуя с NO, образует DNIC, в котором NO окислен (NO^+) и может осуществлять реакции S-нитрозирования. Альтернативное мнение заключается в том, что NO ограничивает активность каспаз не посредством их S-нитрозирования, а влияя на те или иные этапы их процессинга. Антиапоптозному действию NO способствует также и то, что он увеличивает внутриклеточный фонд негемового железа вследствие активизации гемоксигеназ, разрушающих гем. Показано, что NO может усиливать резистентность гепатоцитов и спленоцитов к воздействию повреждающих сигналов. Он усиливает синтез cGMP, что вызывает активизацию соответствующих протеинкиназ и фосфорилирование участвующих в апоптозе белков семейства Bcl-2, BAD, каспазы-9 и других, а также снижение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} . NO стимулирует экспрессию белка теплового шока (Hsp 70) и других цитопротекторных белков - циклооксигеназу-2, металлотионеинов и трансклутаминазу, которая осуществляет Ca^{2+} -зависимую посттрансляционную модификацию ряда ферментов и физиологически активных пептидов. NO угнетает экспрессию недавно открытого гена SRG3, активно участвующего в

индуцируемом глюкокортикоидами апоптозе, т.е. препятствует его развитию [55]. Результаты исследований *in vitro* и *in vivo*, указывают на участие в цитопротекторных механизмах ONOO^- , который в наномолярных и низких микромолярных концентрациях способствует выживаемости миокардиоцитов при ишемии-реперфузии и нейронов, подвергаемых апоптозу [159]. При высоких внутриклеточных концентрациях восстановленного глутатиона цитотоксическое действие ONOO^- трансформируется в защитное, связанное с образованием G-NO. Интересно, что ONOO^- сильно активизирует глюкозо-6-фосфат дегидрогеназную активность и, тем самым, ускоряет глюконеогенез. Вследствие этого накапливается NADPH и, следовательно, в клетках регенерируется глутатион – основной защитный барьер на пути цитотоксического действия NO [21].

Цитотоксическое действие NO направлено преимущественно на митохондрии, что наблюдается при воспалительных и нейродегенеративных процессах, ишемии и других патологиях. Митохондрии, очевидно, не имеют собственной NOS и поэтому являются мишенью для NO, который поступает из цитозоля. В высоких концентрациях NO ингибирует поглощение кислорода и окислительное фосфорилирование, нарушает потенциал и проницаемость мембран, усиливает выход из митохондрий Ca^{2+} и проапоптозных белков (индуцируемого апоптоз фактора и цитохрома C). При этом стабилизируется (возможно за счет S-нитрозирования) транскрипционный фактор-1 (HIF-1), индуцируемый при гипоксии. Он связывается с ДНК и экспрессирует ряд генов, продукты которых переключают ткани на анаэробный путь обмена, в частности усиливают гликолиз и ангиогенез. HIF-1 состоит из субъединиц α и β , первая из которых, в нормальных условиях, разрушается пролингидроксилазами с использованием в качестве субстрата O_2 [11]. Токсическое действие NO на митохондрии усугубляется образованием ONOO^- . Митохондриальному дыханию сопутствует образование O_2^- . Поскольку последний не проникает через мембраны митохондрий, в них содержатся Mn-SOD для его

обезвреживания. Оксид азота, действуя на убихинон дыхательной цепи, усиливает синтез O_2^- и, следовательно, $ONOO^-$. Пероксинитрит в митохондриях окисляет цистеиновые и метиониновые остатки белков, ингибирует комплексы I и II, аконитазу, АТФ-азу, Mn-SOD, креатинкиназу и глутатионпероксидазу, снижает уровень G-SH [39]. Высвобождающиеся под влиянием NO из митохондрий Ca^{2+} и проапоптогенные белки вызывают стресс в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР). Он сопровождается выбросом Ca^{2+} и усилением синтеза небольшого транскрипционного белка Chop, экспрессирующего гены Chop, продукты которых участвуют в апоптозе. Но в эндоплазматическом ретикулуме имеется также и механизм компенсаторной защиты клетки от индуцируемого NO повреждения митохондрий. Ca^{2+} , вышедший из поврежденных митохондрий, вызывает в ЭР разрушение сериновыми протеазами регуляторного стресс-фактора p90 ATF6. При этом образуется белок p50, который, транспортируясь в ядро, усиливает экспрессию цитопротекторного белка Grp78, участвующего в регуляции обмена глюкозы. В некоторых типах клеток, например макрофагах, вызываемая NO гибель клеток связана с быстрым накоплением белка p53, супрессирующего рост опухоли. Его функция, видимо, состоит в том, что он останавливает клеточный цикл, повреждает ДНК и вызывает апоптоз, предохраняя, тем самым, геном от накопления излишних мутаций в условиях генотоксичного стресса. Под влиянием NO усиливается фосфорилирование p53, осуществляемое с помощью митогенактивируемых протеинкиназ (МАРК), вследствие чего стабильность и транскрипционная функция этого белка существенно возрастает. Отмечено также участие протеинкиназ С в модуляции p53-зависимой гибели клеток, вызванной NO. Однако остается неясным, способствует ли активизация протеинкиназ С апоптозу или препятствует его развитию. В условиях нитрозативного стресса выживаемость клеток снижается вследствие угнетения алкилтрансферазной реакции и, следовательно, репарации ДНК. Повреждение ДНК

активизирует поли(АТР-рибоза)синтазу, что усиливает гидролиз АТР, вызывает ее истощение в клеточном фонде и гибель клеток.

Таким образом, умеренное увеличение уровня NO (до 0,5 мкмоль) способствует выживаемости клеток или же оказывает цитопротекторное действие с различными вариантами гибели, которые можно проследить во времени и отнести к апоптозу. Более высокие концентрации NO создают в организме условия нитрозативного и оксидативного стрессов, при которых истощается антиоксидантная защита (снижается уровень GSH, активность соответствующих ферментов) и нарушаются механизмы, репарирующие ДНК. В этих условиях оказываются задействованными все пути реализации цитотоксического действия NO, как прямого, так и опосредованного реактивными интермедиатами, которые изменяют функционирование различных биомолекул и вызывают метаболический дисбаланс. При этом расход макроэргов преобладает над их синтезом, что снижает клеточный фонд АТР. Следовательно, снижение внутриклеточного уровня АТР является одним из ранних этапов клеточной гибели, который до определенного момента времени является обратимым. Последствием усиления катаболизма адениннуклеотидов является трансформация ксантиндегидрогеназы из D-формы (ксантиндегидрогеназной) в O-форму (ксантиноксидазную). Эта трансформация наблюдается в процессе индуцируемой гибели клеток и предшествует фрагментации ДНК. Очевидно, трансформация этих ферментативных функций играет ключевую роль в генезе клеточной гибели, поскольку в реакции, катализируемой O-формой (в отличие от D-формы) в качестве акцептора электронов используется молекулярный кислород и образуются весьма токсичные молекулы O_2^- и H_2O_2 . Основными жизненно важными мишенями их воздействия являются митохондрии, ядра и эндоплазматический ретикулум.

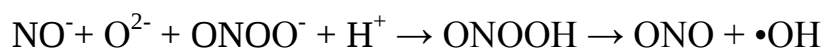
Одним из эффекторов апоптоза является нарушение свободнорадикального метаболизма клетки. Однако однозначного ответа на вопрос об участии NO в запуске апоптоза не существует, точно так же как не

существует однонаправленного участия NO в реакциях защиты клеток от апоптогенных влияний других радикалов.

Известны наблюдения, свидетельствующие о том, что низкие концентрации нитрозоглутатиона оказывают мощное цитопротекторное воздействие в ишемических ситуациях. В нормальных физиологических условиях низкомолекулярные нитрозотиолы, в частности нитрозоглутатион, в концентрациях 6-8 мкМ оказывают цитопротекторный эффект [23, 31]. В таких концентрациях каспазы-1, -3, -8 инактивируются в процессе нитрозилирования их существенных тиолов и, соответственно, тормозится апоптоз, например, в моторных нейронах [99, 208]. Накопление нитрозоглутатиона рассматривается как естественный способ депонирования NO в клетке, так как он стабильнее других возможных эндогенных нитрозотиолов, включая S-нитрозо-цистеинилглицин. Последний высвобождается из глутатиона наряду с остатком глутамата под влиянием энзима гамма-глутамилтранспептидазы, которую можно рассматривать в качестве регулятора концентрации свободного NO в клетках.

Важнейший восстановитель плазмы крови аскорбат не окисляется NO, однако он восстанавливает α -токофероксильные радикалы, а NO может окислять α -токоферол. Эти реакции лежат в основе прооксидантного действия NO в плазме крови [25]. Супероксиддисмутаза (СОД) в условиях оксидативного стресса теряет каталитически важные ионы меди и цинка, что увеличивает содержание супероксид-аниона и пероксинитрита [142].

Токсические эффекты при повышении содержания монооксида азота следует ожидать при создании условий для протекания реакции:



$\bullet\text{OH}$ - основной радикал, вызывающий множественные необратимые изменения нативных молекул нуклеиновых кислот и белков. Кроме этого, пероксинитрит вызывает нитрование циклических аминокислот и

нитрозилирование серосодержащих остатков цистеина в белках и пептидах. Сам по себе NO в большой концентрации имеет точки приложения своего действия в митохондриях, подавляя тканевое дыхание. При нехватке субстратов цикла трикарбоновых кислот (например, при резком ограничении поступления глюкозы в клетки) инициируются апоптотические процессы в клетке, а в модельных ситуациях - нехватка глюкозы в условиях избытка NO - наблюдается некроз клеток.

В спектр токсических воздействий пероксинитрита входит также непосредственное нитрозилирование гуанина и разрывы в цепи ДНК, что также ведет к апоптозу клеток. Эти эффекты пероксинитрита усиливаются при ацидозе, так как в этих условиях образуется ONOON, являющаяся источником гидроксильного радикала. Высокие концентрации доноров NO активизирует enzymes завершающей фазы апоптоза семейства ПАРП и АДФ-рибозилирования. Антиапоптотическое действие NO (в том числе подавление каспаз) сохраняется до тех пор, пока:

- 1) конъюгация с супероксиданионом не приводит к большому избытку пероксинитрита, что нарушает соотношение тиолдисульфидных равновесий и тормозит дыхательной цепи в митохондриях;*
- 2) не происходит образования NO при снижении энергообеспечения клеток подходящими метаболитами глюкозы или другими источниками промежуточных метаболитов цикла трикарбоновых кислот и гексододифосфатного пути окисления углеводов;*
- 3) не нарастает ацидоз, в том числе метаболический;*
- 4) не исчерпывается возможность переводить высокореакционноспособные формы NO в нитрозотиолы.*

Следует также учитывать, что при достаточном поступлении в клетки пластического и энергетического материала оксид азота оказывает разносторонние эффекты, улучшающие протекание внутриклеточного метаболизма, включая связывание свободных радикалов кислорода, в первую очередь, супероксиданиона. Антиапоптотическое действие NO сохраняется

при низких его концентрациях и низких концентрациях других свободных радикалов. Очень высокие концентрации нитрозотиолов (около 1мМ), независимо от действия других свободных радикалов кислорода, вызывают развитие нитрозилирующих реакций, т.е. нитрозилирующий стресс (образование нитрозоаминов, дезаминирование оснований ДНК и других дериватов). В условиях неэффективного энергетического метаболизма митохондрий, снижения оборота и пула никотинамидных коферментов, концентрации свободных тиоловых групп, снижение эффективности синтеза АТФ в митохондриях и повышение - NO сопровождается усилением апоптотических влияний NO и его метаболитов на клетки [129].

Пероксинитрит накапливается не только в результате реакции конъюгации между свободным NO и супероксиданионом. При разрушении СОД в условиях оксидативного стресса, сопровождающегося высвобождением ионов меди, или при высвобождении этого иона из других белков, в клетках появляется возможность быстрого денитрозилирования S-нитрозоглутатиона. Баланс соотношения нитрозотиолы/пероксинитрит смещается в сторону пероксинитрита. Этот процесс, видимо, предопределяет переключение положительных для клетки модулирующих эффектов NO на активизацию апоптоза. Поэтому общая стратегия при терапии состояний, сопровождающихся активизацией свободнорадикального метаболизма на резкое увеличение антиоксидантного потенциала организма, должна быть дополнена принципами лечебных подходов к отдельным звеньям свободнорадикального метаболизма. Таким образом, необходимо учитывать, что цитопротекторный эффект свободного радикала в виде оксида азота в определенной области его эндогенных концентраций сохраняется. Это можно осуществлять под контролем лабораторного анализа МДА, СОД, нитротирозина, гомоцистеина, окислов азота и нитрозотиолов.

Процесс адаптации к гипоксии вовлекает множество систем и механизмов, потому изучение влияния гипоксии на ключевые этиологические процессы приобретает исключительную важность. Одним из

таких процессов является метаболизм одного из наиболее универсальных факторов — регуляторов организма — оксида азота, для синтеза которого уровень кислорода в окружающей среде имеет первостепенное значение.

В организме главным способом защиты от гиперпродукции NO является ингибирование iNOS по механизму отрицательной обратной связи. При связывании NO с гемовым железом NOS образуется комплекс, который препятствует связыванию гема с O₂ [115]. NO и O₂ конкурируют за гемовое железо NOS; O₂ способен вытеснять NO из комплекса с железом и тем самым регенерировать активную форму NOS [116]. Именно этот механизм обеспечивает пропорциональность продукции NO концентрации O₂ во всем физиологическом диапазоне.

Гипоксия значительно влияет на экспрессию генов NOS, индуцируя факторы транскрипции - HIF-1, HIF-2 и NF- κ B. HIF-1 представляет собой гетеродимер, состоящий из α - и β -субъединиц. HIF-1 β экспрессируется конститутивно и в отличие от HIF-1 α , не зависит от концентрации O₂. В условиях нормоксии HIF-1 α распадается за счет O₂-зависимого гидроксилирования пролина. При снижении уровня O₂ с 21 до 5% и более при уровне менее 5% содержание HIF-1 α и активность транскрипции HIF-1 прогрессивно нарастают. После 1 мин реоксигенации HIF-1 распадается, и HIF-1 α подвергается протеолитическому распаду. Считается, что именно HIF-1 за счет такой быстрой динамики обеспечивает адаптацию к периодической гипоксии на уровне транскрипции генов, которая лежит в основе гипоксического стимулирования не только синтеза NO, но и эритропоэза, ангиогенеза и гликолиза. Благодаря активизации HIF-1 по мере формирования адаптации в стенках сосудов усиливается экспрессия гена NO-синтазы, что делает адаптацию более надежной и долговременной [188].

Индукция экспрессии гена iNOS, наблюдающаяся при гипоксии, может быть опосредована фактором транскрипции NF- κ B. При адаптации к периодической гипоксии NF- κ B активизируется под действием реактивных

форм O_2 в периоды реоксигенации [107]. Однако вклад NFkB в повышение продукции NO при периодической гипоксии пока не определен.

На культуре клеток было показано, что после первых 10 мин. умеренной гипоксии в клетку начинает поступать Ca^{2+} , который активизирует eNOS. При более длительном воздействии поступление Ca^{2+} прекращается и синтез NO падает [13]. Вызванный гипоксией вход Ca^{2+} в клетку может не только активизировать eNOS, но и стимулировать iNOS за счет индукции и стабилизации HIF-1 α [171, 205].

Уменьшение продукции NO при острой гипоксии обусловлено ингибированием eNOS или уменьшением доступности кофакторов NOS, но не снижением количества белка этого фермента [189]. Однако хроническая гипоксия может угнетать не только активность eNOS, но и экспрессию ее гена в сосудах большого круга кровообращения, одновременно стимулируя ее в легочных сосудах. Количество белка eNOS в аорте крысы резко падает, а в легких увеличивается уже после 12 час. гипоксии [198]. Число легочных артериол, в которых выявляется экспрессия eNOS, начинает увеличиваться уже после 1-го дня гипоксии; в течение нескольких дней нарастает, а затем остается практически не изменяется на протяжении 4 нед. Предполагается, что гиперпродукция NO в легочных сосудах не всегда благоприятна; она может играть роль в развитии легочной гипертензии, что определяется соотношением между содержанием NO и свободных кислородных радикалов [155].

Данные о влиянии гипоксии на активность и экспрессию eNOS во внелегочных сосудах противоречивы. Увеличение содержания мРНК и белка eNOS наблюдали в эндотелиальных клетках аорты быка, инкубировавшихся при 1% O_2 , в мозговых сосудах при ишемии. Но было показано и снижение экспрессии eNOS клетках пупочной вены человека и эндотелиальных клетках аорты быка за счет дестабилизации eNOS [178].

Типичным примером повреждающего эффекта периодической гипоксии, связанного с дефицитом NO, является синдром апноэ во сне. Оно

характеризуется эпизодической обструкцией дыхательных путей во время сна. Нередко это происходит чаще, чем 60 раз в час, причем насыщение гемоглобина кислородом может падать на 50%. Апноэ отмечается при значительном снижении содержания стабильных метаболитов NO — нитритов и нитратов. При успешном лечении апноэ этот показатель нормализуется [191].

Во время каждого эпизода апноэ АД повышается, что увеличивает напряжение сдвига на сосудистой стенке. Это состояние стимулирует синтез NO в эндотелии и вызывает вазодилатацию. Однако хроническое воздействие на сосуды высоким давлением и напряжением в конечном счете может повреждать эндотелий, угнетать высвобождение NO и вызывать вазоконстрикцию. Существуют и другие возможные факторы угнетения синтеза NO. Прежде всего эпизоды гипоксии лишают NOS необходимого ей кислорода. Кроме того, у пациентов с апноэ значительно повышается уровень эндогенных ингибиторов NO-синтазы. Наконец, повышенный уровень свободных радикалов у пациентов с апноэ, также угнетает синтез NO [192]. Абсолютный или относительный дефицит NO способствует развитию гипертензии, атеросклероза, инфаркта миокарда и инсульта и, тем самым, увеличивает частоту заболеваемости и смерти пациентов с апноэ.

Еще одним примером защитного действия периодической гипоксии против одновременного дефицита и гиперпродукции NO является продемонстрированная адаптационная профилактика экспериментальной болезни Альцгеймера у крыс. Адаптация к периодической гипоксии в барокамере (4000 м над уровнем моря; 4 час. в день в течение 14 дней) предупреждала нейродегенеративное повреждение мозга и нарушение когнитивной функции, вызванные введением токсичного пептидного фрагмента р-амилоида. Этот защитный эффект был NO-зависимым, поскольку ингибитор NOS L-NNA отменял его [173]. Известно, что одним из факторов, усугубляющих нейродегенеративное поражение мозга, является нарушение метаболизма NO, которое, с одной стороны, проявляется в

сниженной активности eNOS в эндотелии мозговых сосудов, а с другой — в токсических эффектах избытка NG, продуцируемого pNOS в нейронах и iNOS в астроцитах и микроглии. В этих условиях защитный эффект периодической гипоксии проявился одновременно в предупреждении дисфункции эндотелия сосудов мозга и ограничении повреждающего действия избытка NO за счет усиленного связывания его в комплексы [71].

По кардиопротекторным эффектам периодическая гипоксия напоминает ишемическое прекондиционирование. Оба воздействия ограничивают последующие реперфузионные аритмии и ишемическое повреждение [163, 180]. В основе защитных эффектов адаптации к периодической гипоксии и прекондиционирования, видимо, лежат сходные механизмы, поскольку эти эффекты не являются аддитивными. В частности, одним из таких механизмов является активизация синтеза NO, которая очень важна как в срочных, так и в отставленных эффектах прекондиционирования. Однако между эффектами прекондиционирования и адаптации к гипоксии имеются и существенные различия. Ишемическое прекондиционирование само по себе вызывает некоторое повреждение, которое инициирует конститутивные защитные механизмы и синтез протекторных белков. Напротив, ни однократное адаптирующее гипоксическое воздействие, ни полный курс адаптации не сопряжены с повреждением миокарда, и "структурная цена" сеанса гипоксии значительно ниже, чем ишемии [210]. Кроме того, защитный эффект адаптации оказывается значительно более стойким, чем эффект прекондиционирования. Отставленная фаза ("второе окно") ишемического прекондиционирования сохраняется 3—4 дня, а адаптационная защита против инфаркта миокарда наблюдается не менее 35 дней [181].

Помимо прямого стимулирования синтеза NO, периодическая гипоксия вовлекает альтернативные, неферментативные источники NO, которые, как правило, не вносят существенного вклада в продукцию NO в условиях нормоксии. Одним из таких источников являются уже упоминавшиеся NO-содержащие комплексы, которые образуют депо NO. Депонирование NO

начинается при любом повышении уровня NO в организме и осуществляется преимущественно S-нитрозотиолами и динитрозильными комплексами железа, которые используются в организме для запаса и транспортировки NO. Депо NO в стенке кровеносных сосудов выявляется наиболее часто по расслаблению сосудов в ответ на N-ацетилцистеин или диэтилдитиокарбамат, которые высвобождают NO из депо и вызывают ответ, пропорциональный объему депо NO [97]. Эффективность депонирования NO увеличивается в условиях хронического повышения уровня NO в плазме крови и снижается при хроническом ингибировании синтеза NO [73]. Причем объем депо NO положительно коррелирует с уровнем нитритов и нитратов в плазме.

Периодическая гипоксия приводит к прогрессивному увеличению объема депо NO. Очевидно, это адаптивный механизм, направленный на защиту сердечно-сосудистой системы от повреждающего избытка NO, который может образоваться при повторных гипоксических воздействиях. Одновременно депо NO может служить дополнительным источником свободного NO при его недостатке в организме. Невозможность сформировать депо NO [96] или его хроническое истощение в процессе адаптации к гипоксии путем введения N-ацетилцистеина препятствует развитию адаптационной защиты [162].

Эффективность депонирования NO генетически детерминирована и, видимо, связана с врожденной интенсивностью синтеза NO. Адаптация к гипоксии стимулирует синтез NO у крыс SHRSP и их генетического контроля Вистар-Киото в одинаковой степени, но объем депо NO у спонтанно-гипертензивных крыс оказывается значительно меньше, чем у нормотензивных [63]. Поскольку у крыс SHRSP содержание свободного NO больше, чем связанного в депо, то гипотензивный эффект периодической гипоксии у них выражен в большей степени. Однако недостаточно эффективное депонирование NO у этих крыс может способствовать повреждению

эндотелия вследствие гиперпродукции NO iNOS в макрофагах и сосудистой гладкой мышце.

Экзогенный NO может либо угнетать, либо активизировать индуцируемый гипоксией ген фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF) в зависимости от редокс-состояния клетки. Эндогенный NO индуцирует синтез VEGF в разных типах клеток, включая макрофаги, сосудистые гладкомышечные клетки и кератиноциты. Это еще один пример того, как оксид азота воспроизводит эффекты периодической гипоксии [139].

Еще один фактор транскрипции, реагирующий на NO, — это HSF-1 — активатор экспрессии протекторных белков теплового шока HSP70 с HSP32 (гемоксигеназа-1), синтез которых увеличивается под действием NO. HSP70 защищает клетки от ишемии [193], апоптоза и некроза и блокирует провоспалительные процессы. HSP32 продуцирует вазоактивные молекулы CO и мощный антиоксидант билирубин, т.е. защищает клетки от оксидативного повреждения, а также опосредует NO-зависимую активацию синтеза и высвобождения VEGF [135].

Роль HSP70 в NO-зависимых механизмах адаптации к периодической гипоксии была доказана тем, что ингибитор NOS L-NNA полностью блокировал как накопление HSP70, так и формирование повышенной устойчивости к тяжелой, острой гипоксии (11 000 м над уровнем моря) при адаптации (5000 м, 10—30 мин в день в течение 8 дней).

Кроме индукции протекторных HSP, избыток NO при периодической гипоксии может мобилизовать другие важнейшие системы эндогенной защиты организма. Так, NO стимулирует синтез цитопротекторных простагландинов PGE₂ и PGI₂, активизируя циклооксигеназы [179], усиливает антиоксидантную защиту, активизируя продукцию антиоксидантов глутатиона [135] и супероксиддисмутазы [148]. Наконец, NO может блокировать апоптоз, предупреждая активизацию каспаз или цитопротекторных белков, таких, как Bcl-xL и гемоксигеназа-1 [128].

Таким образом, периодическая гипоксия может оказывать как защитное, так и повреждающее действие на организм, причем в обоих случаях изменение синтеза и метаболизма NO играет важную роль. Направленность изменений синтеза NO и, в конечном счете, эффекта периодической гипоксии определяется режимом гипоксических воздействий. В основе NO-зависимых защитных эффектов адаптации к периодической гипоксии лежит умеренное стимулирование синтеза NO, которое обеспечивает и компенсацию дефицита NO, и ограничение его гиперпродукции. В свою очередь, NO может увеличивать экспрессию других протекторных факторов, делая адаптационную защиту более надежной и долговременной. Понимание механизмов адаптации к гипоксии поможет разработке новых подходов к предупреждению гипоксических и ишемических повреждений и повышению адаптивных возможностей организма.

Одним из современных методов определения активности воспаления при хронических гастродуоденитах и холециститах у детей является количественный анализ оксида азота и интерлейкинов (ИЛ) в качестве маркеров активности воспалительного процесса и оценки эффективности противовоспалительной терапии. Но степень участия NO и ИЛ в формировании и прогрессировании хронических заболеваний органов пищеварения у детей пока недостаточно изучена. Поэтому изучение изменения содержания NO и ИЛ представляется важным для диагностики и повышения эффективности лечения этих форм патологии.

Показано [78], что обострение хронических гастродуоденита и холецистохолангита у детей сопровождается значимым увеличением содержания NO в сыворотке крови по сравнению с нормой ($24,09 \pm 3,45$ мкмоль/л). Концентрация NO в сыворотке крови больных с обострением хронического холецистохолангита увеличивалось более чем в 3,5 раза ($p < 0,01$) по сравнению с нормой, у детей с обострением хронического гастродуоденита – в 2,4 ($p < 0,05$), а у больных с дискинезией желчных путей – в 1,8 раза ($p < 0,05$). Содержание провоспалительных цитокинов (ИЛ-2, ИЛ-6,

ИЛ-8) в сыворотке крови детей с указанными формами патологии в стадии обострения также повышалось – в 1,4, 2,6 и 2,9 раза от нормы, соответственно. При этом была установлена тесная положительная корреляция между показателями содержания ИЛ-8 и -6 в сыворотке крови и частотой выявления *Helicobacter pylori* у детей с хроническим гастродуоденитом ($r=+0,64$ и $r=+0,67$, соответственно; $p<0,05$).

Таким образом, нарушение содержания оксида азота и ряда провоспалительных цитокинов обусловлено длительным хроническим воспалением, которое поддерживается бактерией *Helicobacter pylori*, изменением моторной функции желчевыводящих путей, уплотнением их стенок, расширением просвета на фоне нарушения микроциркуляции и иннервации верхних отделов пищеварительного тракта у больных детей. Можно полагать, что при описываемых формах патологии органов пищеварения повышение продукции NO непосредственно вовлечено не только в ответ на бактериальную атаку, но и необходимо для оптимизации микроциркуляции и нейрогенного расслабления желчных путей. Повышение уровня метаболитов оксида азота и провоспалительных цитокинов в сыворотке крови особенно выражено при обострении у больных с хроническим гастродуоденитом и холецистохолангитом. Этот факт указывает на высокую активность локального воспалительного процесса, имеет диагностическое значение и определяет необходимость проведения активной комплексной терапии и реабилитации больных.

Экспериментальные и клинические исследования показали важную роль оксида азота в патогенезе воспалительных и иммунопатологических процессов [196], а также его участие в обеспечении протективных свойств слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта. При хроническом воспалении провоспалительные цитокины стимулируют синтез оксида азота. Его концентрация значительно возрастает, а действие становится цитотоксическим.

Оксид азота - это молекула со свойством радикала, являющаяся одним из главных «орудий» антипатогенной активности клеток (макрофагов, моноцитов, нейтрофилов, гепатоцитов, глиоцитов, эндотелиоцитов и др.), которые обеспечивают резистентность организма к проникновению возбудителя и развитию инфекций. NO разрушает множество типов патогенов (вирусы, бактерии, грибы, простейшие, паразиты, раковые клетки) или останавливает их рост. Особый интерес вызывает участие NO в эрадикации внутриклеточных инфекций, естественно защищаемых своими хозяевами от гуморальных агентов, секретируемых во внеклеточное пространство, и (или) от лекарственной терапии. Большинство из этих патогенов проявляют чувствительность к NO-зависимой антипатогенной защите - *M. bovis*, *M. tuberculosis*, *M. leprae*, *Legionella pneumophila*, *Leishmania major*, *Brucella suis*; к ним же относятся и сальмонеллы - (*S. typhimurium*, *S. choleraesuis*) [83]. В лабораторных исследованиях установлен механизм воздействия NO на сальмонеллы. На культуре нейтрофилов здоровых добровольцев выявлено, что оксид азота и 4-метилбромфенацил бромид (БФБ) стимулируют формирование длинных тубуловезикулярных удлинений из нейтрофилов человека. Эти удлинения служат клеточными сенсорными и связывающими органеллами, с помощью которых в присутствии представителей NO-доноров (диэтиламиндиоксида азота и др.) или БФБ нейтрофилы человека связывают и агрегируют сальмонеллы [149].

Кислородо-независимые механизмы связаны с наличием в первичных и вторичных гранулах лейкоцитов микробоцидных ферментов, белков, пептидов. Это –белок, повышающий проницаемость бактерий (BPI) фосфолипаза А (ФЛА), лизоцим, катепсины, лактоферрин, белок, связывающий витамин В₁₂, 4 вида α-дефензимов, располагающихся в первичных гранулах, и 2 вида β-дефензимов (кроме нейтрофилов) во вторичных гранулах, кателицидины, находящиеся во вторичных гранулах лейкоцитов. Все эти вещества действуют на микроорганизмы

(грамположительные и грамотрицательные бактерии, в том числе, сальмонеллы, грибы, простейшие, оболочечные вирусы) [83].

Особую функцию в регуляции процессов клеточной смерти выполняет оксид азота. Известно, что он обладает провоспалительным эффектом и воздействует на иммунную систему [169]. Но показано и антиапоптотное действие оксида азота: он стабилизирует каспазы и блокирует Fas-индуцированный путь развития ПГК.

На раннем этапе инфицирования защиту хозяина осуществляют фагоцитирующие клетки – МФ, нейтрофилы и ДК. Они контролируют размножение бактерий, генерируя через индуцибельную синтазу окиси азота (iNOS) реактивные азотные радикалы [174].

Фермент NO-синтаза стимулирует образование радикалов оксида азота, которые разрушают фагоцитированные объекты [83, 108]. NO-синтаза (iNOS) в норме практически не обнаруживается в клетках (макрофагах, полиморфноядерных лейкоцитах и гепатоцитах), однако ее синтез индуцируется под действием провоспалительных и антипатогенных факторов ИФН- γ , ФНО- α , бактериального липополисахарида (ЛПС).

Оксид азота имеет значение в развитии заболеваний легких. Обнаружена статистически значимая отрицательная коррелятивная связь между уровнем нитрит-анионов в крови и величиной объема форсированного выдоха за 1-ю с ($r = -0,77$; $p < 0,05$) у пациентов с ХОБЛ. Результаты указывают на то, что даже в стадии ремиссии при ХОБЛ наблюдаются изменения метаболизма NO, отражающие развитие нитрозивного стресса. При сочетании ХОБЛ с хронической ишемией головного мозга изменения исследованных показателей, помимо нитрозивного стресса, очевидно, связаны с особенностями функционирования нитрит-редуктазных систем [44].

Х.М. Марков [66] показал важную роль NO в патогенезе ряда заболеваний у детей, а также новые подходы к терапии, основанной на

усилении или подавлении образования NO в организме в зависимости от конкретных сдвигов его содержания.

У больных тяжелой формой бронхиальной астмы образование NO значительно снижено по сравнению со здоровыми детьми того же возраста. Это согласуется с экспериментальными и клиническими данными, свидетельствующими о выраженном бронхолитическом и сосудорасширяющем действии NO в легких. Можно обоснованно полагать, что недостаток NO при бронхиальной астме повышает тонус гладких мышц бронхов и сужает их. В основе дефицита NO лежит, по-видимому, избыточное образование эндогенных ингибиторов NO-синтазы, как и при некоторых формах системной гипертензии [195].

О патогенетическом значении дефицита NO при бронхиальной астме свидетельствует и тот факт, что ингаляция очень низких концентраций NO (5-20 пмоль) дает благоприятный терапевтический эффект при ряде заболеваний легких, сопровождающихся бронхоспазмом, легочной гипертензией и другими нарушениями. Следует, однако, иметь в виду реальную возможность передозировки NO со всеми вытекающими последствиями, что делает эту процедуру довольно рискованной и потому возможной только в высокоспециализированных лечебных учреждениях. Повышение же образования NO в организме больных бронхиальной астмой другими способами (препаратами, увеличивающими активность NO-синтазы, предшественниками NO и т.п.) является более доступным, легко контролируемым и практически безопасным.

С учетом того факта, что действие NO на тонус бронхов, сосудов и ряд других процессов жизнедеятельности весьма близко по характеру с аналогичными сдвигами, возникающими под влиянием некоторых эйкозаноидов исследовано взаимодействие биосинтетической активности двух систем арахидоновая кислота-эйкозаноиды (простагландины, простаноиды, лейкотриены) и L-аргинин-NO на клеточном уровне при бронхиальной астме. Результаты показали в тромбоцитах прямую

корреляционную зависимость между синтезом NO простагландина - ингибитора конститутивной E2. Введение L-NAME изоформы NO-синтетазы активизировало циклооксигеназный и липоксигеназный пути метаболизма арахидоновой кислоты (повышало синтез проагрегационного тромбоксана A_2 и провоспалительного лейкотриена B_4 , соответственно). Подавление же циклооксигеназного пути метаболизма арахидоновой кислоты индометацином вызывало существенно повышало образование NO в тромбоцитах.

В гранулоцитах установлена отрицательная корреляционная связь между образованием NO и простаглицина (простаглицин (I2). L-NAME не вызывал каких-либо изменений в системе арахидоновая кислота-эйкозаноиды, очевидно, потому, что этот ингибитор не подавляет индуцируемую изоформу NO-синтетазы, характерную для гранулоцитов. С другой стороны, индометацин нарушал образование гранулоцитарного NO в зависимости от его содержания в клетке: исходно повышенный уровень NO – еще более повышался, а исходно низкий - снижался.

У детей с астматическим бронхитом показано, что L-аргинин в малых дозах достоверно снижает активность Na/K-АТФазы [18]. Судя по тому, что этот эффект наступал быстро и не зависел от присутствия ионов кальция, авторы предполагают, что он связан с активизацией индуцируемой изоформы NO-синтетазы. Установлена прямая корреляционная зависимость активности обоих ферментов от содержания магния, что предполагает его участие в стимуляции активности индуцируемой NO-синтетазы или ее непосредственной активизации.

Исследовано также влияние NO-системы на АТФазную активность в эритроцитах у детей с церебральными параличами с точки зрения важной роли NO в регуляции ряда функциональных отправления центральной и периферической нервных систем [65]. Несмотря на то, что АТФазная активность оказалась существенно ниже у этих больных, чем при

астматическом бронхите, влияние L-аргинина на этот фермент было аналогичным у обеих групп больных.

НО-система существенно повышает перекисное окисление липидов у детей с астматическим бронхитом и церебральными параличами: увеличивается содержание диеновых конъюгатов и конечных продуктов перекисного окисления липидов в плазме крови [17, 18].

Известно также, что оксид азота играет важную роль в развитии патологий сетчатки и зрительного нерва. В сетчатке глаза относительно высокая концентрация оксида азота обнаруживается в двух слоях – во внутренних сегментах фоторецепторного слоя и слое ганглиозных клеток. Оксид азота регулирует синаптическую передачу, одним из медиаторов которой является глутамат [49]. Сетчатка глаза находится в тесном контакте с ретинальными сосудами, которые проходят через все ее внутренние слои и снабжают их кислородом и необходимыми метаболитами. Оксид азота, обладая сосудорасслабляющим свойством, регулирует состояние сосудов в норме и при патологиях и, следовательно, значительно влияет на работу всех элементов сетчатки. Это особенно важно в условиях гипоксии, когда недостаток кислорода вызывает ишемию сетчатки – причину многочисленных офтальмологических заболеваний.

С другой стороны оксид азота может быть нейротоксичным, приводя к апоптозу нервных клеток. Предполагаемой причиной этого является взаимодействие оксида азота с супероксид-анион радикалом с образованием пероксинитрита. Последний может разлагаться с образованием гидроксильного радикала – сильного токсического агента, приводящего, среди прочего, к апоптотической гибели клеток.

Результаты исследований имеют важное теоретическое и практическое значение для понимания роли оксида азота при развитии нейродегенеративного процесса, вызванного ишемией. Данные об участии оксида азота в развитии патологических заболеваний сетчатки глаза ставят

вопрос о новых стратегиях лечения таких заболеваний сетчатки глаза, как глаукома, диабетическая ретинопатия и др. Разработана модель, позволяющая отличить патологическое действие гипоксии от патологического действия внутриглазного давления, вызывающего дегенерацию нервных клеток. На этой модели показано, что оксид азота является необходимым элементом в развитии апоптоза, вызванного исключительно ишемическим повреждением. Это принципиально важно для разработки лекарственных средств и понимания механизмов возникновения ряда зрительных патологий. Обнаруженный защитный эффект нитритов при развитии ишемии вследствие гипоксии имеет важное значение для разработки антиишемических средств лечения глазных патологий [49].

Особый интерес биологические эффекты NO вызывают у кардиологов, поскольку NO является нейромедиатором, мощным фактором гемостаза, антиагрегантом, эндогенным вазодилататором, обладает стресс-лимитирующим эффектом [62], принимает непосредственное участие в механизмах модуляции иммунного ответа [109].

Свойство оксида азота ингибировать агрегацию тромбоцитов также связано с его способностью активизировать растворимую гуанилатциклазу, которая, в свою очередь регулирует агрегацию по механизму обратной связи: инициация агрегации активизирует фермент, а накапливающийся cGMP опосредует сигнал к дезагрегации и ингибирует агрегацию через общий механизм торможения накопления Ca^{2+} . Таким образом, гуанилатциклазу можно рассматривать как защитный механизм на пути развития агрегации. В этой связи направленная активизация гуанилатциклазы оксидом азота и NO-генерирующими соединениями может быть использована для ослабления повышенной способности тромбоцитов к агрегации. А поскольку регуляторная роль гуанилатциклазы проявляется на самых ранних стадиях агрегационного процесса, то новые активаторы фермента будут способны не только ослаблять гиперагрегацию, но и предупреждать их спонтанную

агрегацию, т.е. предупреждать возникновение и развитие сосудистых осложнений.

Дефицит NO способствует развитию артериальной гипертензии и патологии коронарных сосудов. Так, эксперименты на подопытных животных выявили существование причинной связи между понижением секреции NO и возникновением артериальной гипертензии. Механизм этого действия объясняется двумя факторами: во-первых, тем, что NO является (наряду с простаглинном и др.), активатором гуанилатциклазы [40] и расслабляет гладкую мускулатуру сосудов; во-вторых, NO оказывает на артериальное давление депрессивное действие, вероятно, за счет влияния на паравентрикулярные ядра гипоталамуса и ядро одиночного пути.

Установлено, что избыток содержания эндогенных блокаторов NOS является одной из причин почечной гипертензии [199].

Исследования с донаторами и ингибиторами NO показали, что их внутрикоронарное введение оказывает непосредственное влияние на тонус венечных артерий у больных атеросклерозом либо гиперхолестеринемией. Так, при атеросклерозе венечных артерий внутрикоронарное вливание ингибитора NO - ацетилхолина вызывает парадоксальную реакцию – сужение диаметра субэндокардиальных артерий, тогда как у здоровых людей подобная процедура вызывает их расширение. Опыты с донатором NO L-аргинином показали, что при его внутрикоронарном введении у больных гиперхолестеринемией значительно увеличивался венечный кровоток, что подтверждает роль NO в регуляции тонуса коронарного русла. При этом отмечено, что дисфункция сосудистого эндотелия проявляется, видимо, задолго до развития клинически значимых признаков атеросклероза [137].

Благодаря своим сосудорасширяющим свойствам и способности угнетать генерацию O^{2-} фагоцитирующими клетками NO играет ключевую защитную роль в ишемическом поражении миокарда [72].

Известно также обязательное участие оксида азота, выделяющегося в синоатриальном узле, в автономном контроле сердцебиения [72]. NO может также участвовать в процессах ремоделирования сосудов.

Доказана роль NO в регуляции сосудистого тонуса легких при гипоксии: острая блокада синтеза NO усиливала гипоксическую вазоконстрикцию. Недостаточное образование и выделение NO является преимущественным механизмом развития гипертензии малого круга и потери легочными сосудами способности отвечать вазодилатацией на эндотелийзависимые субстанции при хронической гипоксии. Во многих случаях ингаляции NO устраняют легочную вазоконстрикцию, связанную с гипоксией, первичной легочной гипертензией, сердечными пороками, респираторным дистресс-синдромом взрослых [76].

Увеличение концентрации NO является одним из патогенетических звеньев различного вида шоков [22]. Доказано, что прогрессивное снижение артериального давления в случаях затяжного инфекционно-токсического шока, обусловлено повышенной секрецией окиси азота в результате экспрессии индуцибельной NOS под влиянием воспалительных стимулов. При этом отмечена рефрактерность даже к большим дозам вазоконстрикторов, и доказано, что сразу же после внутривенного назначения ингибиторов NO артериальное давление у таких больных повышается. Аналогичная ситуация установлена и при геморрагическом шоке.

Концентрация NO в крови увеличивается не только при шоке, но и при многих других болезнях, для большинства которых характерна гипотония и понижение резерва сократительной функции сердца. Отрицательное инотропное действие провоспалительных цитокинов на изолированную папиллярную мышцу опосредуется NO, который является эффективной молекулой цитокинов. Развитие недостаточности кровообращения при системных воспалительных реакциях также связано с гиперпродукцией NO в сосудах под действием воспалительных стимулов [103].

В кардиомиоцитах больных дилатационной кардиомиопатией была обнаружена индуцибельная NOS, которая в здоровых кардиомиоцитах не встречается. В экспериментальных исследованиях выявлено отрицательное хронотропное действие NO на миокард. Повышенное содержание NO в крови является, по-видимому, одной из причин нарушения сократительной функции сердца при дилатационной кардиомиопатии, миокардите и инфаркте миокарда [138, 175].

Известно, что местные сосудистые реакции, вследствие атеросклероза и разрушения эндотелия, также вызывают экспрессию индуцибельной NOS и, соответственно, приводят к гиперпродукции оксида азота [103].

Таким образом, нарушение содержания оксида азота в организме (как дефицит, так и избыток) способствует развитию самой разнообразной патологии сердечно-сосудистой системы.

Снижение секреции NO вызывает артериальную гипертензию, патологию коронарных сосудов, прогрессирование предтромботических и тромботических состояний, нарушение микроциркуляции, усилению гипоксической вазоконстрикции легочных сосудов. Оксид азота играет ключевую защитную роль в ишемическом поражении миокарда, участвует в патогенезе ишемического инфаркта мозга, процессах ремоделирования сосудов, активизации стресс-лимитирующих факторов, в механизмах модуляции иммунного ответа.

Чрезмерное повышение концентрации NO в крови приводит к гипотонии и понижению резерва сократительной функции сердца, является одним из патогенетических звеньев различного вида шоков.

Таким образом, для кардиологов вопросы поддержания физиологического уровня концентрации и функционального состояния эндогенного NO в организме человека представляются чрезвычайно актуальными как в научном, так и в практическом отношении.

Особое значение имеет тот факт, что эффективность работы цикла оксида азота резко повышается при функциональных нагрузках, связанных с

усиленной утилизацией кислорода, при ишемиях мозга и миокарда, при многочисленных патологических процессах, протекающих в условиях гипоксии. Лишь в тех случаях, когда использование кислорода будет полностью компенсироваться его поступлением, роль цикла окиси азота может оставаться такой же, какую он выполняет в обычных физиологических условиях. Следовательно, роль цикла окиси азота резко возрастает при таких заболеваниях, как ишемическая болезнь сердца и мозга, артериальная гипертензия, врожденные и приобретенные пороки сердца, миокардиодистрофии.

К сожалению, пока препараты на основе описанных соединений не внедрены в клиническую практику. Кроме того, фармакологическая коррекция содержания NO может сопровождаться возникновением нежелательных побочных эффектов, поскольку в клинике пока отсутствуют доступные методы определения концентрации оксида азота в кровотоке.

Образование NO при ферментативном окислении L-аргинина является уникальным биохимическим феноменом. Эксперименты на животных показали его чрезвычайно важную роль в регуляции сосудистого тонуса, активности тромбоцитов и лейкоцитов, нейротрансмиссии и нейромодуляции, в обеспечении толерантности организма к патогенам. Некоторые из этих функций NO начинают успешно использоваться в терапии ряда заболеваний легких, сосудов, мозга [87]. Применение уже известных фармакологических средств и разработка новых для воздействия на физиологические и патофизиологические процессы, опосредуемые оксидом азота, несомненно, приведет к значительному прогрессу в лечении атеросклероза, гипертонии, диабета и др. Кроме того, следует учитывать биологические явления, связанные с NO, при изучении побочных эффектов традиционных терапевтических препаратов, а также вновь разрабатываемых средств для применения в иных областях медицины [87].

При терминальных состояниях (септический шок, синдром длительного раздавливания, уремическое кровотечение) наблюдается резкое

повышение уровня в крови NO: активизированные в гепатоцитах и макрофагах NOS увеличивают продукцию NO более чем в 1000 раз. Большинство исследователей полагает, что цитотоксическое/цитостатическое действие NO обусловлено его способностью в реакции с супероксидным радикалом продуцировать пероксинитрит. Этот анион сравнительно стабилен при физиологических значениях pH. Но при патологии он в течение секунд распадается, окисляя различные внутриклеточные мишени, что и определяет цитотоксическое действие, вызывающее гибель клеток и тканей по механизмам апоптоза и некроза [16, 43].

Одним из важных для медицины свойств NO является его способность инициировать в клетках и тканях синтез белков теплового шока, усиливающих восстановление тканей и структур, поврежденных в результате апоптоза [43]. Причем синтез может инициироваться как эндогенным NO, так и введением в организм животных различных доноров NO. Подобный результат достигается при разных типах адаптации к факторам среды, как правило усиливающим продукцию NO: например, токсический шок, синдром длительного раздавливания, ишемический инсульт, инфаркт миокарда, эпилепсия, болезни Паркинсона, Альцгеймера и др. [16].

NO в виде нитрозотиолов необходим для осуществления важнейших регуляторных и цитопротекторных процессов на уровне органелл клетки и всего организма. Но проблема управления внутриклеточными цитопротекторными функциями NO мало изучена [35, 122, 207]. Проводя фармакотерапевтическое воздействие методами, вмешивающимися в связывание и гашение свободных радикалов, необходимо учитывать, что при этом связываются такие физиологически важные парамагнитные молекулы, как монооксид азота. С другой стороны, излишнее назначение доноров NO влечет за собой и неблагоприятные последствия. Нарушение этого звена метаболизма в эндотелии и окружающих клетках формирует состояние оксидативного и нитрозилирующего стресса. Клетки субэндотелия (макрофаги, фибробласты, гладкомышечные и др.) и клетки крови также

участвуют в развитии указанных нарушений метаболизма АФК и регуляции кровообращения. Дисфункция клеток, связанных с образованием, транспортом и использованием (метаболизмом) физиологически важного свободного радикала – NO, может являться непосредственной причиной развития тяжелых состояний, заключающихся в развитии атеротромботических осложнений.

С энергетикой митохондрий тесно связана одна из существенных функций этих органелл – накапливать значительное количество кальция и обмениваться ионами кальция с внутриклеточным окружением. Митохондрии обладают Ca^{2+} -транспортной системой, включающей Ca^{2+} -унипортер, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ - и $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -обмен. Накопление ими кальция осуществляется, главным образом, через унипортер, активность которого зависит от величины мембранного потенциала, создаваемого на внутренней мембране сопряженной работой дыхательной цепи и протонного насоса – митохондриальной АТФ-азы.

Известно, что оксид азота оказывает влияние на различные Ca^{2+} -транспортные системы клетки, в частности на Ca^{2+} -АТФ-азу эндоплазматического ретикулума и $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмен плазматической мембраны [187].

Установлено, что митохондрии быстро накапливают кальций, поступающий в клетку под действием физиологических стимулов. Сейчас активно изучается влияние NO на митохондриальный транспорт Ca^{2+} , что в конечном итоге позволит глубже понять некоторые механизмы его вовлечения в регуляцию клеточного гомеостаза кальция [197].

Около десяти процентов нейронов в мозге имеют ферменты, способные высвобождать оксид азота из разных химических соединений [167].

NO широко представлен в центральной и периферической нервных системах. Он выделяется в постсинаптических нейронах под влиянием нейротрансмиттеров, из которых наиболее изучен глутамат.

Известно, что глутамат, синтезируемый пресинаптическими нейронами, стимулирует N-метил-D-аспартат-рецепторы (NMDA-рецепторы) постсинаптических нейронов, активизация которых повышает внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} , затем, усиливает активность pNOS и, соответственно, - синтез NO. NO специфически не связывается с рецепторами постсинаптической мембраны (как в случаях с классическими нейротрансмиттерами), но диффундирует в другие участки, включая пресинаптические нейроны (т.е. действует как ретроградный мессенджер) и другие смежные нейроны и глиальные клетки. Полагают, что NO действует, вероятно, как нейромодулятор, скорее опосредуя динамическую активность нейронов, а не прямо влияя на активность их потенциалов [36].

Вегетативная нервная система также производит оксид азота: в синапсах, нервных окончаниях, иннервирующих разные органы.

Оксид азота ингибирует активность системы гипоталамус-гипофиз-надпочечники, посредством аргинин-вазопрессина. Вместе с тем, ингибиторы синтазы NO (L-NMMA и L-NAME) сужают региональные артерии, снижают почечный кровоток, скорость клубочковой фильтрации и повышают системное артериальное давление.

Давно известная болезнь - диффузный спазм пищевода вызывается тоническим спазмом его гладких мышц. В основе болезни также лежит дефицит NO, так как внутривенное вливание нитроглицерина (поставщика NO) сопровождается исчезновением спазма. Возможно, что и в основе неправильной работы сфинктера 12-перстной кишки (а значит и язв желудка), тоже лежит недостаточное количество NO, в результате чего этот клапан теряет способность функционировать.

Кроме того, NO следует отнести к числу наиболее важных факторов защиты слизистой желудка, так как он воздействует на ее кровоснабжение. Блокада NOS резко уменьшает кровоток в сосудах слизистой. Косвенно это сказывается на секреторной функции желудка, на способности его слизистой

противостоять воздействию факторов агрессии, на возникновении и заживлении эрозий и язв.

Иммуногистохимическими методами установлено содержание NOS в нейронах сплетения Ауэрбаха. Их электрическая стимуляция сопровождается секрецией NO и релаксацией кишечника, что предотвращается назначением ингибиторов NOS. Нейроны, содержащие NOS, обнаружены также в адвентиции сосудов желудочно-кишечного тракта, т.е. NO является нейротрансмиттером и в периферических нервах желудочно-кишечного тракта.

Доказано, что в различных отделах почки представлены все три изоформы NOS и продуцируемый с их участием NO является важным регулятором почечной гемодинамики и гломерулярной фильтрации, ингибирует транспорт натрия и увеличивает его экскрецию.

Известно, что одним из составных компонентов клеточной оболочки является тот же холестерин. Учитывая распространенность источников NO в организме, в том числе NO-синтаз, вероятно образование линейных NO-молекул и в клеточной оболочке. Их роль в межклеточных взаимодействиях может быть весьма большой и дополнять систему управления ткани или органа с помощью химических или биологических факторов. Более того, нарушение межклеточных связей может оказаться решающим этапом в автономизации группы клеток и началом процесса малигнизации. Известна большая группа канцерогенных веществ, относящихся к группе N-нитрозосоединений, которые являются тканеспецифичными канцерогенами и к которым чувствительны практически все виды животных.

Связь эндотелиальной функции и оксида азота

Сосудистый эндотелий представляет собой орган массой 1,5-1,8 кг (сопоставим с массой, например, печени) или непрерывный монослой эндотелиальных клеток длиной 7 км, или занимающий площадь футбольного поля, или шести теннисных кортов. Без этих пространственных аналогий

трудно представить, что тонкая полупроницаемая мембрана, отделяющая кровоток от глубинных структур сосуда, непрерывно вырабатывает огромное количество важнейших биологически активных веществ, являясь таким образом гигантским паракринным органом, распределенным по всей территории человеческого организма.

Основная барьерная роль эндотелия - поддержание гомеостаза путем сложной активной регуляции равновесного состояния противоположных 4-х процессов:

- 1) тонуса сосудов (вазодилатация или вазоконстрикция);
- 2) анатомической архитектоники сосудов (синтез или ингибирование факторов повреждения или пролиферации);
- 3) гомеостаза (синтез или ингибирование факторов фибринолиза и агрегации тромбоцитов);
- 4) местного (выработка про- или противовоспалительных факторов).

В конце XX в. не только интенсивно вырабатывались фундаментальные понятия патогенеза артериальной гипертензии (АГ), но и были критически пересмотрены многие представления о причинах, механизмах развития и лечении этого заболевания.

Каждая из четырех функций эндотелия, определяющая тромбогенность сосудистой стенки, воспалительные изменения, вазореактивность и стабильность атеросклеротической бляшки, напрямую или косвенно связана с развитием, прогрессированием атеросклероза, АГ и ее осложнений [130]. Действительно исследования показали, что надрывы бляшек, приводящих к инфаркту миокарда, отнюдь не всегда происходят в зоне максимального стенозирования коронарной артерии, напротив, зачастую случаются в местах небольших сужений – менее 50 % по данным ангиографии [61].

Таким образом, изучение роли эндотелия в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) позволило понять, что эндотелий регулирует не только периферический кровоток, но и другие важные функции. Именно

поэтому объединяющей стала концепция об эндотелии как о мишени для профилактики и лечения патологических процессов, приводящих или реализующих ССЗ.

Понимание многоплановой роли эндотелия уже на качественно новом уровне вновь заставляет вспомнить известный, но хорошо забытый принцип «здоровье человека определяется здоровьем его сосудов».

Считается, что медикаментозное или немедикаментозное воздействие на ранних стадиях (предболезнь или ранние стадии болезни) способно отсрочить ее наступление или предотвратить прогрессирование и осложнения. Ведущая концепция превентивной кардиологии основана на оценке и коррекции так называемых факторов сердечно-сосудистого риска. Объединяющим началом для всех таких факторов является то, что рано или поздно, прямо или косвенно, все они вызывают повреждение сосудистой стенки, и прежде всего, в ее эндотелиальном слое.

Дисфункция эндотелия – это, прежде всего, дисбаланс между продукцией вазодилатирующих, ангиопротективных, антипролиферативных факторов с одной стороны (NO, простациклин, тканевой активатор плазминогена, С-тип натрийуретического пептида, эндотелиального гиперполяризующего фактора) и вазоконстриктивных, протромботических, пролиферативных факторов - с другой (эндотелин, супероксид-анион, тромбоксан А₂, ингибитор тканевого активатора плазминогена). При этом, механизм их окончательной реализации неясен.

Среди изобилия биологически активных веществ, вырабатываемых эндотелием, важнейшим является оксид азота – NO. Сегодня – это самая изучаемая молекула, вовлеченная в патогенез АГ и ССЗ в целом. Нарушенное взаимоотношение ангиотензина-II и NO вполне способно определять развитие АГ.

Нормально функционирующий эндотелий отличается непрерывная базальная выработка NO с помощью эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) из L-аргинина. Этот процесс необходим для поддержания нормального

базального тонуса сосудов. В то же время, NO обладает ангиопротективными свойствами, подавляя пролиферацию гладкой мускулатуры сосудов и моноцитов, и предотвращая, тем самым, патологическую перестройку сосудистой стенки (ремоделирование), прогрессирование атеросклероза.

Известно, что NO может синтезироваться в нейронах на одной из стадий глутаматного каскада и, являясь свободным радикалом, быть очень токсичным. Установлено, что наиболее чувствительными к воздействию NO являются мембраны нейронов и глиальных клеток. При этом оксид азота преимущественно «перфорирует» клеточные мембраны, а глутамат увеличивает их текучесть и расслоение.

Раскрыты многие звенья патогенеза ишемического инсульта, основанные на роли NO нейронального и макрофагального происхождения в формировании зон ишемического повреждения. Большое значение NO имеет в регуляции мозгового кровообращения. Установлено, что NO нейронального происхождения участвует в формировании «ядра» при инфаркте мозга, а макрофагального происхождения – в доформировании зоны ишемического повреждения головного мозга.

Предполагается, что при инфаркте головного мозга высокие концентрации оксида азота (образованного при участии nNOS и iNOS), диффундируя к сосудам, повреждают их, вызывают отек сосудистой стенки, повышают ее проницаемость, вязкость крови, агрегационные свойства форменных элементов.

Оксид азота – один из универсальных медиаторов биологических эффектов в мозге, и его продукция возрастает при черепно-мозговой травмы. Доказано, что все три изоформы фермента: индуцибельная, эндотелиальная и нейрональная формы синтазы оксида азота – увеличивают свою активность в посттравматическом периоде.

Публикации о роли NO в патогенезе судорожных расстройств противоречивы. Одни исследователи показали, что судорожный эффект агониста глутаматных рецепторов каиновой кислоты сопровождается

увеличением содержания NO в мозге [92]; другие - что эпилептические припадки индуцируются ингибитором NOS L-гуанидиноглутаровой кислотой, ее эффект контролируется L-аргинином [156].

Роль оксида азота в развитии сальмонеллезной инфекции на фоне хронического гелиотринового гепатита

Экспериментальные и клинические исследования установили роль оксида азота в патогенезе воспалительных и иммунопатологических процессов [14, 196], а также в обеспечении протективных свойств слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта [185]. Можно предположить, что от активности отдельных компонентов NO-системы зависит метаболический эффект оксида азота, его негативное влияние на процессы белкового, углеводного и жирового обменов. Однако эта активность при развитии сальмонеллезной инфекции и гепатита недостаточно изучена. Поэтому на кафедре биоорганической и биологической химии Ташкентской медицинской академии исследована степень активности ферментов eNOS и iNOS, экспрессии NO и ONO_2^- в сыворотке крови 120 белых крыс-самцов при формировании сальмонеллезной инфекции на фоне хронического гелиотринового гепатита. Животные были распределены на 4 группы: 1-я – животные с острым экспериментальным сальмонеллезом; 2-я – с хроническим гелиотриновым гепатитом; 3-ья - с хроническим гелиотриновым гепатитом и острой сальмонеллезной инфекцией; 4-я – контрольная (интактные крысы). Сальмонеллезную инфекцию моделировали внутрижелудочным однократным введением штамма *S.typhimurium* (1 млрд. микробных тел на 100 г. массы животных). Животных 1-ой группы деапитировали под рауш-наркозом на 1-, 4-, 7-, 10-е сутки после их заражения.

Хронический токсический гепатит (ХТГ) воспроизводили пероральным введением раствора гелиотрина, подкисленного соляной кислотой (pH- 7,0)

из расчета 50 мг/кг (5 мг гелиотрина на 100 г) массы тела один раз в неделю на протяжении 42 дней по методике Н. Х. Абдуллаева и соавт. [1]. Летальность составила 8%. Животных 2-ой группы декапитировали на 60-, 90- и 120-ый дни от начала эксперимента. Согласно результатам, полученным ранее [51], более выраженные признаки хронического гепатита были обнаружены на 90-ый день эксперимента, поэтому заражение сальмонеллезной инфекцией проводили в этот срок, а исследования проводили на 1-, 4-, 7- и 10-е сутки.

Состояние NO-ергической системы в надосадочной жидкости гомогенатов слизистой желудка и кишечника оценивали по концентрации основных стабильных метаболитов NOx (NO₂ и NO₃) по методу П.П.Голикова [31], активность NO-синтаз (NOS): эндотелиальной (eNOS) – по В.В.Сумбаеву, И.М.Ясинской [104] и индуцибельной (iNOS) - по методу N.W. Кооу и соавт. [104] в модификации Р.К. Азимова, А.С. Комарина [164]. Уровень пероксинитрита (ONOO⁻) также определяли в модификации Р.К. Азимова и А.С. Комарина после его окисления гидроксиламином (NH₂O).

Опыты проводили в соответствии с международными нормами, принятыми при работе с экспериментальными животными. Результаты исследования обрабатывали с помощью прикладных программ Statistica 6, Biostat. Данные представлены в виде средних арифметических значений (M) и стандартных отклонений (m). Для сравнения выборок применяли t-критерий Стьюдента. Уровень значимости считали достоверным при P<0,05.

Результаты исследования показателей системы оксида азота в сыворотке крови при сальмонеллезной инфекции приведены в рисунке № 1.

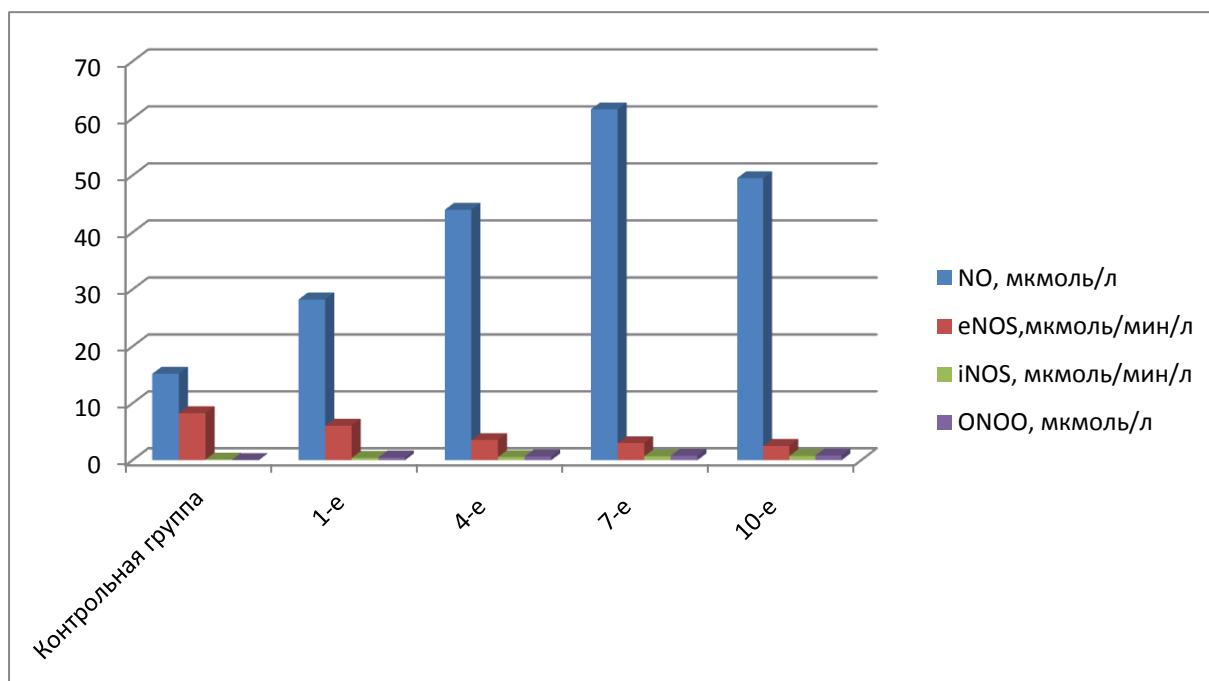


Рис.1 Показатели системы оксида азота сыворотки крови при сальмонеллезной инфекции

Как видно из данных рисунка № 1, увеличение содержания оксида азота в сыворотке крови животных с острым сальмонеллезом увеличивается во все сроки исследования по сравнению с контрольной группой. Если повышение оксида азота на 1-е сутки исследования повышено 1,86 раза, то на 4- и 10-е сутки повышение его содержания составило 2,89 и 3,26 раза соответственно по сравнению с контрольной группой. Наиболее выраженное увеличение его содержания установлено на 7-е сутки эксперимента, и оно составило 4,05 раза по сравнению с показателем контрольной группы.

Исследование активности eNOS в сыворотке крови показало снижение его активности во все сроки исследования. Если на 1- и 4-е сутки снижение активности данного фермента составило 1,4 и 2,3 раза, то на 7- и 10-е сутки снижение более выражено и составило 2,8 и 3,2 раза соответственно по сравнению с контрольной группой. Как видно из представленных данных наиболее выраженное угнетение активности eNOS происходит на 10-е сутки эксперимента по сравнению с животными контрольной группы.

Активность фермента iNOS, в противоположность активности eNOS, повышается во все сроки эксперимента. Если активность данного фермента на 1-е сутки эксперимента повышается 3,36 раза, то на 4- и 7-е сутки повышение его активности составляет 4,59 и 5,65 раза соответственно по сравнению с контрольной группой. Наиболее выраженное повышение iNOS установлено на 10-е сутки эксперимента ($0,75 \pm 0,055$ мкмоль/мин/л при $0,122 \pm 0,01$ контроле мкмоль/мин/л).

Выявленная повышенная индукция iNOS приводит к повышению содержания пероксинитритов. Так, если содержание ONOO⁻ на 1- и 4-е сутки эксперимента повышено 8,7 и 11,8 раза соответственно по сравнению с контрольной группой, то его увеличение на 7- и 10-е сутки соответственно по сравнению с контрольной группой составило 14,4 и 15,1 раза.

Таким образом, результаты проведенных исследований показали увеличение содержания оксида азота, пероксинитритов в сыворотке крови при остром сальмонеллезе во все сроки исследования, особенно выражено на 7- и 10-е сутки эксперимента и оно сопровождалось снижением активности eNOS при одновременном повышении активности iNOS.

Результаты исследования показателей системы азота сыворотки крови при хроническом гелиотриновом гепатите показало, что содержание оксида азота повышается во все сроки исследования (рис. 2). Нами установлено, что на 60- и 90-ый дни развития хронического гелиотринового гепатита содержание оксида азота повышается в 2,86 и 3,03 раза соответственно по сравнению с животными контрольной группы. Наиболее выраженное повышение содержания оксида азота выявлено на 90-ый день эксперимента и его увеличение составляет 3,55 раза по сравнению с контрольной группой.

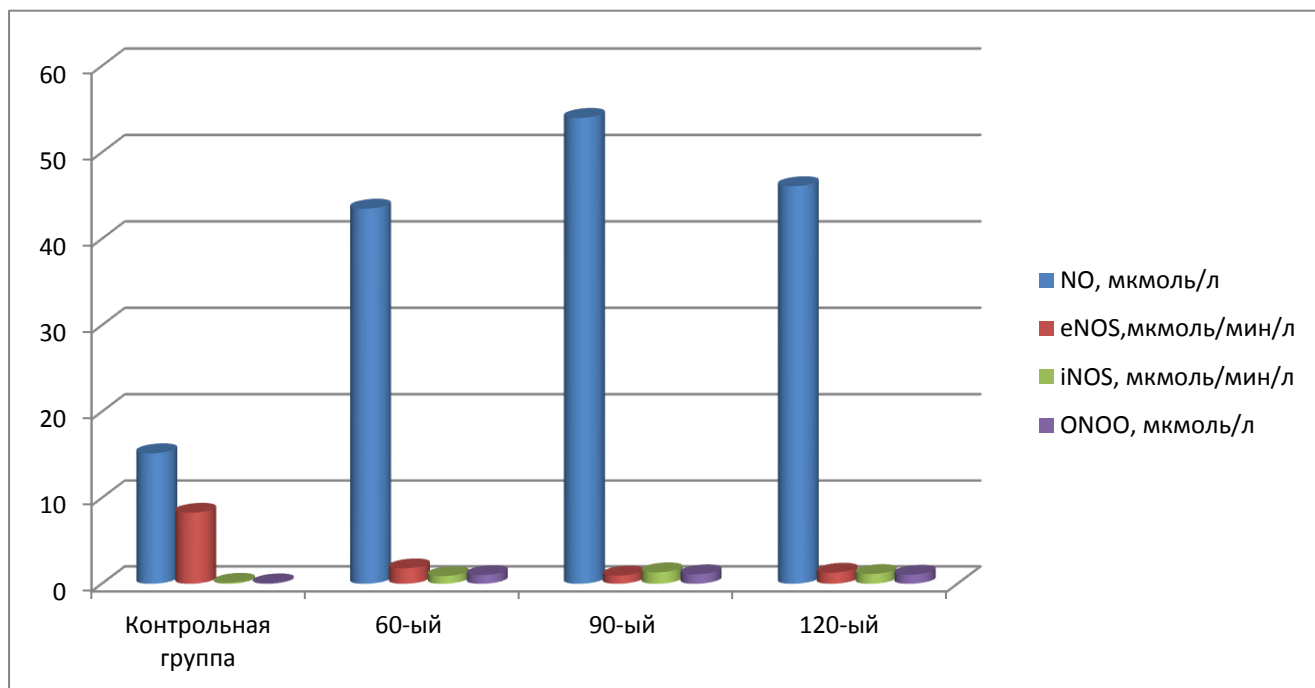


Рис 2. Показатели системы оксида азота сыворотки крови при хроническом гелиотриновом гепатите

Исследование активности фермента eNOS показало снижение ее во все сроки исследования. Если снижение активности данного фермента на 60- и 120-ый сутки развития хронического гелиотринового гепатита составило 4,6 и 6,4 раза соответственно по сравнению с контрольной группой, то на 90-ый сутки установлено наиболее выраженное снижение – 8,6 раза по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$).

Активность фермента iNOS на 60- и 120-сутки повышается 7,4 и 9,3 раза ($p < 0,05$) соответственно по сравнению с контрольной группой. Наиболее выраженное повышение активности данного фермента нами установлено на 90-сутки и оно составило 11 раз по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$). В результате такого повышения активности фермента iNOS происходит усиленное образование пероксинитритов. В наших исследованиях нами установлено повышение содержания ONOO^- на 60-, 90- и 120-сутки эксперимента на 18,4, 20,2 и 19,3 раза соответственно по сравнению с контрольной группой.

Таким образом, результаты проведенных исследований показали, что в динамике развития хронического гелиотринового гепатита происходит изменения в системе оксида азота в сыворотке крови, которое характеризовалось повышением содержания оксида азота, пероксинитритов, повышением активности iNOS, снижением – eNOS. Эти изменения были наиболее выражены на 90-сутки эксперимента по сравнению с 60- и 120-суткой исследования.

Установлено, что при развитии острой сальмонеллезной инфекции на фоне хронического гелиотринового гепатита (3-ья группа) содержание оксида азота в сыворотке крови достоверно увеличивается на 1-, 4-, 7- и 10-е сутки в 3; 3,9; 4,4 и 4,8 раза, соответственно (табл.1). По сравнению с острой сальмонеллезной инфекцией (1-я группа) превышение выявлено в 1-, 4- и 10-е сутки - на 63,4; 35,2 и 48,6%, соответственно. Достоверное отличие от группы с хроническим гепатитом (2-я группа) на 7- и 10-е сутки эксперимента составило 23,9 и 36,3%, а на 1-е сутки этот показатель был ниже на 14,54%.

Активность eNOS у животных с острым сальмонеллезом в указанные сроки была ниже показателей контрольной группы в 1,4; 2,3; 2,8 и 3,3 раза, соответственно. Хронический гелиотриновый гепатит более выраженно снижал активность этого фермента – в 8,6 раза от контроля. Особенно сильное угнетение eNOS мы установили у животных с микст-инфекцией – в 10,35; 13,6; 19,7 и 28,55 раза, соответственно (особенно к концу эксперимента). Таким образом, наибольшее нарушение активности фермента установлено у животных 3-ей группы.

Активность iNOS при сальмонеллезе превышала контроль в 3,4; 4,6; 5,65 и 6,1 раза, соответственно срокам эксперимента. При хроническом гелиотриновом гепатите наибольшая активность фермента установлена на 90-ый день - в 11 раз выше показателя контрольной группы. У крыс с микст-инфекцией активность превышала все показатели сальмонеллезной группы, особенно в 1-е сутки – в 2,6 раза. В этот же срок она была достоверно ниже,

чем у животных 90-ого дня хронического гелиотринового гепатита на 19,4%. Но на 4-, 7- и 10-сутки эксперимента изучаемая активность уже превышала показатели 2-ой группы на 16,4; 68,6 и 94,8%, соответственно, т.е. выявлена более выраженная индукция данного фермента при микст-инфекции.

Содержание пероксинитритов в сыворотке крови у животных с острым сальмонеллезом прогрессивно увеличивалось в 1-, 4-, 7- и 10-е сутки эксперимента – в 8,7; 11,8; 14,4 и 15,1 раза, соответственно, по сравнению с контролем. На 60-, 90- и 120-ый дни развития хронического гелиотринового гепатита содержание пероксинитритов превышало контроль в 18,4; 20,2 и 19,3 раза. Наибольшее нарушение данного показателя от контроля и обеих групп выявлено у животных 3-ей группы: на 7- и 10-е сутки его превышение составило 43,2 и 59,4%, соответственно.

Таким образом, при развитии только сальмонеллезной инфекции и только хронического гепатита нарушаются показатели нитроергической системы в крови: повышаются содержание оксида азота и пероксинитритов и активность iNOS, снижается активность eNOS. Эти нарушения значительно усугубляются при сочетании этих патологий. Ответные реакции инфицированных организмов зависят от активности NO-синтазы, генерирующей образование молекул NO, которые, реагируя с радикалом супероксидного аниона, образуют высокотоксичный продукт – пероксинитрит (ONOO^-). Он может вызывать обширную нитрацию тканей и окисление различных биохимических компонентов клеток. Пероксинитрит – сильный окислитель, способный окислять NH- и SH-группы белков, что приводит, в частности, к инаktivации $\alpha 1$ -ингибитора протеаз, тканевого ингибитора металлопротеиназ-1, Mn-супероксиддисмутазы и Fe-супероксиддисмутазы [108].

Гиперпродукция NO обычно обусловлена экспрессией iNOS под действием цитокинов и опосредована активизацией ядерного фактора транскрипции NFkB. Избыток NO инаktivирует железосодержащие белки, к которым относятся и дыхательные ферменты митохондрий, и ингибирует

рост и размножение клеток. Кроме того, соединяясь с кислородными радикалами, NO образует пероксинитрит, который участвует в повреждении ДНК и мутации [180]. Повышенное образование NO вследствие индукции NO-синтазы, вероятно, защищает организм от воздействия инфекционного агента.

Республика Узбекистан относится к регионам Центральной Азии, где широко распространены хронические гепатиты вирусной этиологии [2, 4, 48]. В последние годы широкое распространение получили хронические гепатиты и циррозы смешанной этиологии [113, 45]. Присоединение инфекции другой этиологии приводит к ускорению декомпенсации функции печени и может привести к смерти больного [165,170]. Вместе с тем на фоне хронических гепатитов (ХГ) присоединение вторичной инфекции специфической этиологии может усугубляться синдромом субклеточного роста бактерий, изменится их спектр и активность со сдвигом в сторону их агрессивности и тяжело поддающихся общепринятому лечению [27, 166]. Особое место в этой проблеме отводится риску развития инфекционных осложнений у больных ХГ сочетанной с сальмонеллезной инфекцией [118, 28], которая является одной из самых распространенных инфекций не только на территории Узбекистана, но и во всех регионах мира [28, 54]. По данным ВОЗ, удельный вес его составляет более 1,3 млрд случаев в год [80]. Существенным звеном патогенеза сальмонеллеза является нарушение тканевого гомеостаза слизистой оболочки (СО) гастроинтестинального тракта, причем вовлечение в процесс толстой кишки отмечается в 62-82% случаев [106]. Важным фактором нарушения тканевого гомеостаза СО гастроинтестинального тракта при этом выступает полнокровие и венозный застой. Все это предполагает участие в патогенезе дестабилизации клеточных и внутриклеточных мембран в СО гастроинтестинального тракта у больных сочетанной патологией ХГ и сальмонеллеза нарушений со стороны функции эндотелия. Важным регулятором функции эндотелия является оксид азота. В настоящее время NO рассматривают как сигнальную молекулу

пищеварительной системы, так как он стимулирует расслабление гладких мышц пищевода, желудка, тонкой и толстой кишки, желчного пузыря, сфинктера печечно-поджелудочной ампулы (Одди) [152]. В физиологических условиях эндогенный NO – один из медиаторов внешней секреции поджелудочной железы, секреции секреторными и слизеобразующими клетками СО желудка и кишечника, устойчивость и неспецифическую и специфическую защиту СО от действия внутренних и внешних агрессивных факторов среды [88, 84]. Можно полагать, что с нарушениями в активности NOS усиливаются процессы проникновения через СО желудка и кишечника в местную систему кровообращения, а затем через воротную вену в печень экотоксинов и тем самым усиливает нагрузку на детоксикационную активность гепатоцитов, что еще в большей степени осложняет тяжесть развития в нем патологического процесса, увеличивает попадания в общую циркуляцию и в ткани СО желудка и кишечника при сальмонеллезе эндотоксинов. Вместе с тем в литературе отмечается разные сведения о состоянии NOS в СО желудка и кишечника, ее роли в патогенезе при сочетанном действии ХГ и сальмонеллезной инфекции, что определяет актуальность проблемы и необходимость проведения исследований в этом направлении.

Результаты исследования состояния системы оксида азота в слизистой желудка при остром сальмонеллезе приведены в рисунке № 3.

Как видно из данных, приведенных в рисунке № 3, хотя патологический процесс локализован в тонком кишечнике, в слизистой желудка происходят изменения в системе оксида азота. Нами выявлено достоверное увеличение содержания оксида азота во все сроки развития острого сальмонеллеза 1,2; 1,3; 1,7 и 2 раза соответственно по сравнению с животными контрольной группы. Эти данные указывают на более выраженное увеличение содержания оксида азота на 7- и 10-е сутки эксперимента по сравнению другими сроками развития патологического процесса.

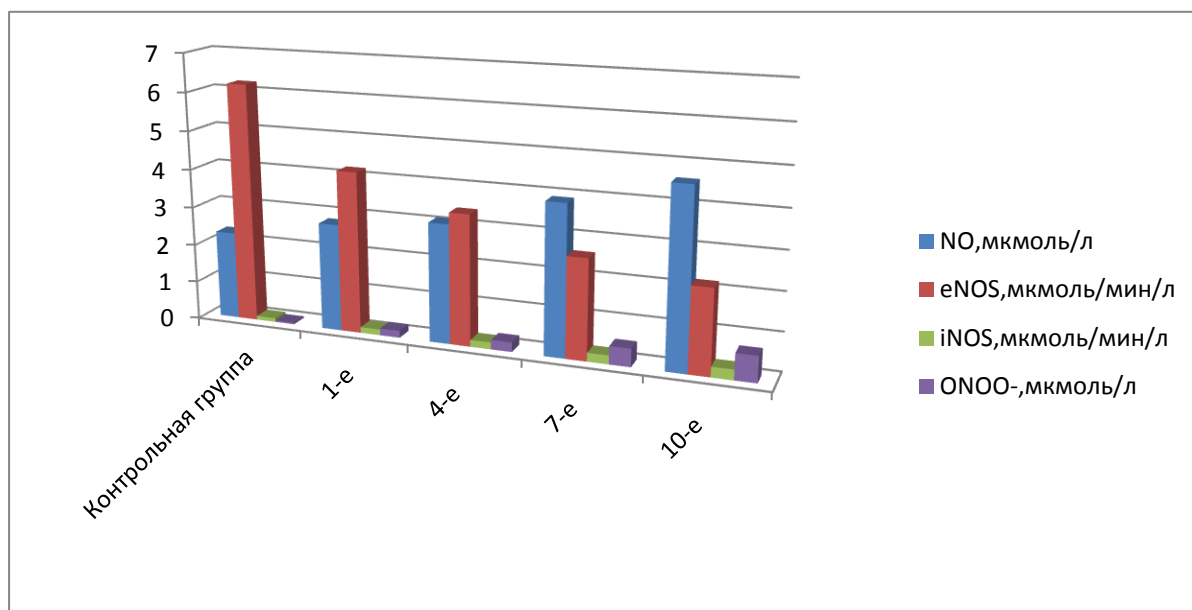


Рис 3. Показатели системы оксида азота слизистой желудка при остром сальмонеллезе

Острый сальмонеллез сопровождался с понижением активности фермента eNOS на 1- и 4-сутки исследования на 1,5 и 1,8 раза соответственно по сравнению с контрольной группой. На 7- и 10-сутки эксперимента мы установили более выраженное угнетение активности eNOS и оно составило 2,4 и 2,8 раза соответственно по сравнению с данными животных контрольной группы.

При изучении активности фермента iNOS в слизистой желудка на 1- и 4-е сутки развития острого сальмонеллеза установлено повышение его активности 1,5 и 1,8 раза соответственно по сравнению с контрольной группой. На 7- и 10-сутки эксперимента выявлена более выраженная индукция данного фермента и оно составило 2,3 и 2,7 раза соответственно выше по сравнению с контрольной группой.

Увеличение содержания пероксинитритов на 1-, 4-, 7- и 10-е сутки эксперимента составило 4,5; 6,25; 11,75 и 17 раза соответственно по сравнению с животными контрольной группы.

Таким образом, состояние системы оксида азота в слизистой желудка при остром экспериментальном сальмонеллезе характеризуется повышением содержания оксида азота, пероксинитритов и индукцией активности фермента iNOS, особенно, на 7- и 10-е сутки развития патологического процесса.

Как видно из данных рисунка № 4, при хроническом гелиотриновом гепатите в показателях системы оксида азота на 60-ый день достоверных изменений не происходит. На 90- и 120-ые дни эксперимента содержание оксида азота снижается на 1,2 и 1,3 раза соответственно по сравнению с контрольной группой. Такое уменьшение содержания оксида можно объяснить понижением активности фермента eNOS. Активность фермента eNOS на 90- и 120-дни развития хронического гепатита снижается 1,3 и 1,4 раза соответственно по сравнению с контрольной группой.

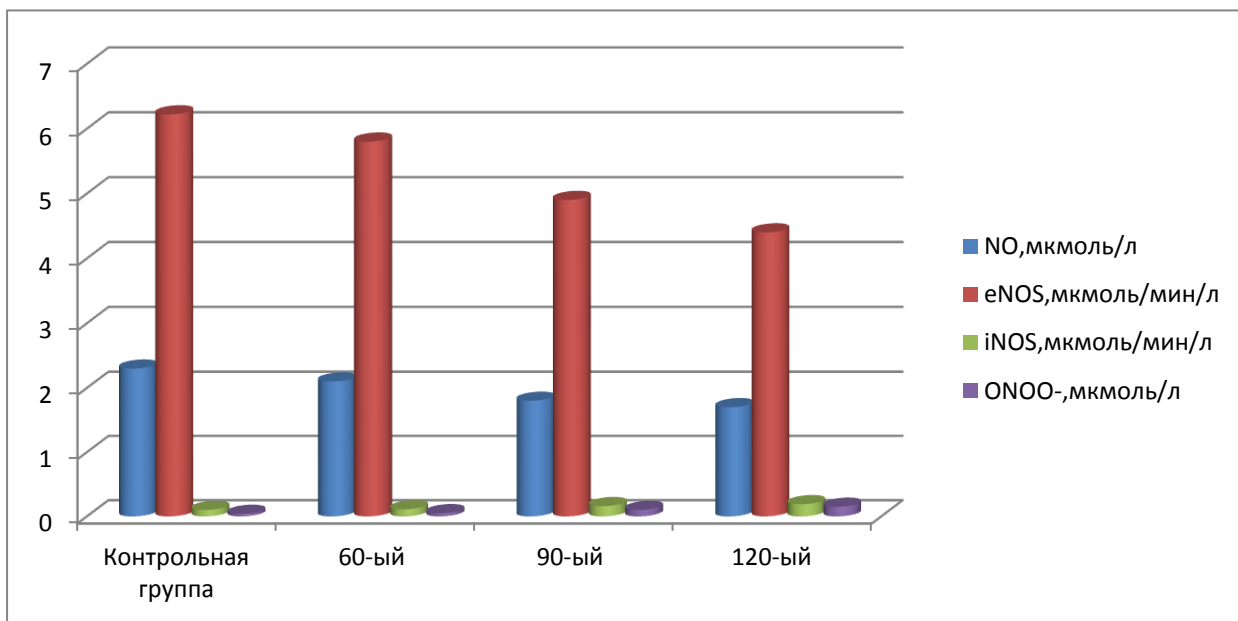


Рис. 4 Показатели системы оксида азота слизистой желудка при хроническом гелиотриновом гепатите

Активность фермента iNOS в отличие от фермента eNOS в слизистой желудка при хроническом гелиотриновом гепатите на 90- и 120-ые дни

повышается в 1,6 и 1,9 раза соответственно по сравнению с контрольной группой.

Как известно, усиление индукции iNOS приводит к повышенному образованию пероксинитритов. Содержание ONOO⁻ в 90- и 120-ые дни повышается 2,5 и 3,75 раза соответственно по сравнению с контрольной группой.

Таким образом, результаты проведенных исследований показали более выраженное изменение в системе оксида азота при хроническом гелиотриновом гепатите происходит на 120-день эксперимента, которое выражалось уменьшением содержания оксида азота, понижением активности eNOS, увеличением индукции iNOS и соответственно повышением содержания пероксинитритов.

В наших исследованиях мы изучили состояние системы оксида азота в слизистой желудка при остром сальмонеллезе на фоне хронического гелиотринового гепатита (табл.2).

Как видно из данных таблицы №2, в слизистой желудка животных микст инфекцией содержание оксида азота снижается на 1-, 4-, 7- и 10-сутки эксперимента 1,5; 2,5; 3,3 и 4,5 раза соответственно по сравнению с контрольной группой. Сравнение содержания оксида азота в слизистой желудка животных микст инфекцией с данными животных острым сальмонеллезом в соответствующие сроки показало повышение его содержания в 1,2; 1,9; 2 и 2,3 раза соответственно. Сопоставление содержания оксида азота при микст инфекции и на 90-ый день развития хронического гепатита показало его повышение на 1,9 раза на 1-е сутки микст инфекции. На 4-, 7- и 10-е сутки эксперимента содержание оксида азота по сравнению с 90-ым днем хронического гепатита повышается на 3,3; 4,3 и 5,8 раза соответственно.

Активность фермента eNOS в слизистой желудка у животных с микст инфекцией на 1-, 4-, 7-и 10-сутки эксперимента достоверно снижается 1,9; 2,8; 3,1 и 3,6 раза соответственно по сравнению с контрольной группой. По

сравнению с животными острым экспериментальным сальмонеллезом снижение активности данного фермента во все сроки исследования составило 1,3; 1,5; 1,3 и 1,3 раза соответственно. В то же время сравнению с группой животных 90-ым днем хронического гепатита у животных данной группы снижение активности фермента eNOS во все сроки исследования составило 1,5; 2,2; 2,4 и 2,9 раза соответственно.

Изучение активности фермента iNOS в слизистой желудка у животных с микст инфекцией показало индукцию данного фермента на 1-, 4-, 7- и 10-е сутки эксперимента на 1,8; 2,7; 3,6 и 4,3 раза по сравнению с животными контрольной группы. Исследование активности данного фермента в слизистой животных микст инфекцией показало повышение активности данного фермента на 1-, 4-, 7- и 10-е сутки эксперимента на 1,2; 1,5; 1,6 и 1,6 раза соответственно по сравнению с животными острым сальмонеллезом. А по сравнению с группой животных хроническим гепатитом установлено увеличение активности данного фермента на 4-, 7- и 10-е сутки эксперимента и оно составило 1,7; 2,2 и 2,7 раза соответственно.

Выявленное резкое повышение активности iNOS привело к выраженному повышению содержания ONOO^- в слизистой желудка у животных с микст инфекцией на 1-, 4-, 7- и 10-сутки на 10,5; 15,7; 24,5 и 37,5 раза соответственно по сравнению с животными контрольной группы. При сопоставлении данных животных микст инфекцией и острым сальмонеллезом показало повышение его содержания соответственно срокам исследования на 2,3; 2,5; 2,1 и 2,2 раза.

Сопоставление данных о содержании пероксинитритов с 90-суткой хронического гепатита показало его увеличение на 4,2; 6,3; 9,8 и 15 раза соответственно.

Таким образом, результаты проведенных исследований показали, что изменения в системе оксида азота слизистой желудка при микст инфекции более выражены на 7- и 10-е сутки эксперимента по сравнению с животными острым сальмонеллезом и хроническим гепатитом.

Исследование состояния системы оксида азота в слизистой кишечника показало увеличение содержания оксида азота на 1-, 4-, 7- и 10-сутки развития острого сальмонеллеза 1,4; 1,9; 2,2 и 2,9 раза соответственно по сравнению с контрольной группой (табл.№2). Эти данные указывают на более выраженное увеличение оксида на 7- и 10-е сутки развития острого сальмонеллеза.

При исследовании активности eNOS понижение его активности на 1-е сутки эксперимента составило 1,5 раза по сравнению с контрольной группой. На 4-е сутки острого сальмонеллеза активность eNOS достоверно снижается в 1,7 раза по сравнению с контрольной группой. На 7- и 10-е сутки выявлено более выраженное понижение его активности и оно составило 1,9 и 2,3 раза соответственно по сравнению с контрольной группой. Именно этим можно объяснить выраженное повышение содержания оксида азота в слизистой кишечника на 7- и 10-е сутки эксперимента.

Активность iNOS в слизистой кишечника при развитии острого сальмонеллеза на 1-, 4-, 7- и 10-е сутки повышается в 2,1; 3; 4,4 и 4,8 раза соответственно по сравнению с контрольной группой.

Исследование содержания пероксинитритов в слизистой кишечника в динамике развития патологического процесса показало динамичное повышение его в зависимости от сроков исследования и оно составило 4; 5,9; 8,6 и 13,2 раза соответственно по сравнению с контрольной группой.

Таким образом, результаты проведенных исследований показали, что острая сальмонеллезная инфекция сопровождается изменением состояния системы оксида азота в слизистой кишечника, степень изменений зависит от срока исследования и активности ферментов данной системы.

Результаты наших исследований показали, что в динамике развития хронического гелиотринового гепатита в слизистой кишечника происходят изменения в системе оксида азота (табл.№2).

Установлено достоверное снижение содержания оксида азота в слизистой кишечника на 90- и 120-ые дни развития хронического гепатита

1,3 и 1,5 раза соответственно по сравнению с животными контрольной группы.

Активность фермента eNOS в слизистой кишечника также снижается на 90- и 120-ые дни исследования и составило 1,4 и 1,5 раза соответственно по сравнению с контрольной группой. В то же время исследование активности iNOS показало повышение его индукции по сравнению с контрольной группой. Так, на 90- и 120-ые дни развития хронического гепатита повышение активности данного фермента составило 1,6 и 2,1 раза соответственно по сравнению с контрольной группой.

Содержания пероксинитритов в слизистой кишечника на 90- и 120-ые дни развития хронического гепатита составило 1,8 и 2,1 раза по сравнению с животными контрольной группы.

Таким образом, результаты проведенных исследований показали изменения в системе оксида азота в слизистой кишечника в динамике развития хронического гелиотринового гепатита, которое выражалось уменьшением содержания оксида азота, резким снижением активности eNOS, повышением активности iNOS и содержания пероксинитритов, на 90- и 120-ые дни эксперимента.

Местом поражения при сальмонеллезной инфекции является тонкий кишечник, а также нам известно то, что при гепатитах в патологический процесс вовлекается и кишечник. В связи с этим мы изучили показатели системы оксида азота слизистой кишечника при сальмонеллезной инфекции на фоне хронического гепатита.

Результаты исследования показали (табл.№2) повышение содержания оксида азота в слизистой кишечника на 1-, 4-, 7- и 10-е сутки развития острого сальмонеллеза на фоне хронического гепатита в 1,7; 2,5; 3,2 и 3,8 раза соответственно по сравнению с животными контрольной группы.

Результатами наших исследований нами было установлено снижение содержания оксида азота в слизистой кишечника при развитии хронического гепатита. При остром сальмонеллезе, развившемся на фоне хронического

гепатита, происходит увеличение содержания оксида азота на 1-, 4-, 7- и 10-е сутки развития микст инфекции в 2,3; 3,3; 4,3 и 5,1 раза соответственно по сравнению с животными на 90-ые сутки развития хронического гепатита. Эти данные указывают на то, что хотя хронический гепатит приводит к снижению содержания оксида азота, но его сочетание с острым сальмонеллезом приводит к повышению содержания оксида азота.

Исследование активности фермента eNOS у животных острым сальмонеллезом, развившемся на фоне хронического гепатита показало снижение его активности на 1-, 4-, 7- и 10-сутки эксперимента на 1,8; 2,1; 2,6 и 3,2 раза соответственно по сравнению с животными контрольной группы, то есть наиболее выраженная репрессия данного фермента происходит на 7- и 10-е сутки микст инфекции и поэтому именно в эти сроки и происходит более выраженное образование оксида азота в слизистой кишечника.

Активность фермента iNOS, в отличие от фермента eNOS, в слизистой кишечника у животных с микст инфекцией в исследованные сроки повышается 3,5; 5,8; 6,8 и 11 раза соответственно по сравнению с контрольными животными. Результаты сравнения активности iNOS у животных с микст инфекцией с данными животных с острым сальмонеллезом показало, что на 1-, 4-, 7- и 10-е сутки активность данного фермента повышается 1,7; 1,9; 1,5 и 2,3 раза соответственно. Эти данные указывают на то, что хотя во все сроки исследования активность данного фермента повышается, но более выраженное повышение его активности установлено на 10-е сутки, а на 7-е сутки прослеживается некоторое понижение его активности по сравнению с другими сроками исследования.

В результате такого выраженного повышения активности iNOS в слизистой кишечника животных с микст инфекцией происходит увеличение содержания пероксинитритов. На 1-, 4-, 7- и 10-е сутки развития микст инфекции содержание пероксинитритов повышается 6,3; 9,3; 12,1 и 16,3 раза соответственно по сравнению с животными контрольной группы. Сравнение содержания пероксинитритов в слизистой кишечника животных микст

инфекцией с данными животных только острым сальмонеллезом и 90-ым днем хронического гепатита показало увеличение его содержания на 1-, 4-, 7- и 10-е сутки 1,6; 1,6; 1,4; 1,2 и 3,6; 5,3; 6,9; 9,3 раза соответственно.

Таким образом, при остром экспериментальном сальмонеллезе, развившемся на фоне хронического гелиотринового гепатита, происходят более выраженные изменения в слизистой кишечника в системе оксида азота, которые проявляются в резком повышении активности фермента iNOS и накоплении пероксинитритов.

В группе животных с хроническим гелиотриновым гепатитом отмечается с увеличением срока наблюдения в СО желудка и кишечника динамическое снижение концентрации основных стабильных метаболитов NO. Уменьшение концентрации NO, можно полагать, было связано ее снижением в тканях СО желудка и кишечника активности eNOS. Среди причин низкой активности eNOS в СО желудка и кишечника при ХГГ важным фактором, по-видимому, выступает экспрессия ONO_2^- , как следствие инициации активности iNOS. При активации iNOS образуются высокие концентрации NO, которые в условиях патологии клетки вступают в реакции с супероксидным кислородом (O_2^-) с образованием ONO_2^- [Стародубцева М.Н. Пероксинитрит в физиологии и патологии клеток крови//М.: «Медицина».-2011.-200с.]. Следовательно, полученные результаты показали, что при хроническом гелиотриновом гепатите в тканях СО желудка и кишечника наблюдается выраженная дисфункция эндотелия (ДЭ), характерной особенностью которой является снижение уровня NO. Необходимо подчеркнуть, что развитие сальмонеллезной интоксикации в отличие от хронического гелиотринового гепатита проявляется статистически значимым повышением в СО желудка и кишечника NO по сравнению с группой животных после 90-е сутки опыта и контролем. Другие показатели NOS – eNOS, iNOS и ONO_2^- имели ту же направленность в СО желудка и кишечника, что и при ХГГ. При развитии сальмонеллезной инфекции на фоне хронического гелиотринового гепатита отмечается, что с

увеличением срока наблюдения отмечается прогрессирующее увеличение в СО желудка и кишечника уровня NO, снижение активности eNOS, экспрессия iNOS и NO_2^- . Выявленная различная направленность в изменении уровня NO в СО желудка и кишечника, можно полагать, было продиктовано с различным механизмом воздействия на NOS факторов среды. Повидимому, при хроническом гелиотриновом гепатите активность eNOS снижается вследствие действия на ткани СО желудка и кишечника эндотоксинов, поступающих в центральный кровоток из печени одновременно инициируют iNOS и образование ONO_2^- , которые приводят к угнетению eNOS. Вместе с тем при сальмонеллезной интоксикации на активность eNOS в тканях СО желудка и кишечника одновременно воздействуют эндотоксины и патогенная флора сальмонеллезной инфекции как внешний агрессивный фактор, и образующие эндотоксины – липополисахариды (ЛПС) клеточной стенки грамотрицательных бактерий, проникающие через СО желудка и кишечника в местную систему кровообращения, через воротную вену в печень, а затем в общий кровоток, вызывающий поражение всего организма, в том числе в сосуды микроциркуляции интестинальных ворсин СО желудка и кишечника [82]. В наших исследованиях это проявляется потенцирующим эффектом действия токсинов сальмонеллезной инфекции и эндотоксинов образующихся в печени при ХГГ на угнетение активности в СО желудка и кишечника активности eNOS, инициацией iNOS, образования ONO_2^- важного цитотоксического/цитостатического соединения усиливающего пролиферативные и проапоптотические процессы [190], как следствие, высокого уровня деградации и десквамации интестинального эпителия СО желудка и кишечника.

Таким образом, полученными результатами исследований установлено, что в механизме синдрома эндогенной интоксикации, высокой пролиферации эпителия в СО желудка и кишечника лежат процессы ДЭ, что еще в большей степени способствует агрессивности желудочно-кишечной микрофлоры,

вызванной сальмонеллезной инфекцией и ее транслокации, которые еще в большей степени усиливаются на фоне ХГГ.

Состояние NO-системы в микросомах желудка при язвенном поражении, резекции и ваготомии

Молекулярные механизмы, лежащие в основе развития осложнений после резекции и ваготомии желудка при его язвенном поражении остаются одной из нерешенных проблем современной патофизиологии. Не изучена роль дисфункции эндотелия в механизмах формирования постхирургических осложнений в желудке при его язвенном поражении (ЯП). До сих пор вызывает споры значение NO-системы в формировании пострезекционного и постваготомического синдрома при язвенной болезни желудка) ЯБЖ, процессах адаптации СОЖ при хирургическом лечении.

Операции резекцию и поддиафрагмальную двустороннюю ваготомию проводили у животных с 10-суточной моделью ЯПЖ, которую воспроизводили по методу В.А. Вертелкина и соавт. [20]. По данным С.А.Сайфуллаевой (2010) через 10 суток после воспроизведения ЯП в микросомальной фракции СОЖ уровень основных стабильных метаболитов NO_x - NO_2 и NO_3 был ниже, чем у интактных животных на 34,5%, а активность NOS - на 42,6%. Скорость ферментативной реакции НАДФН-зависимой НР и концентрация ONOO^- , напротив, превышали контрольные значения на 119,4 и 114,3% (рис. 5).

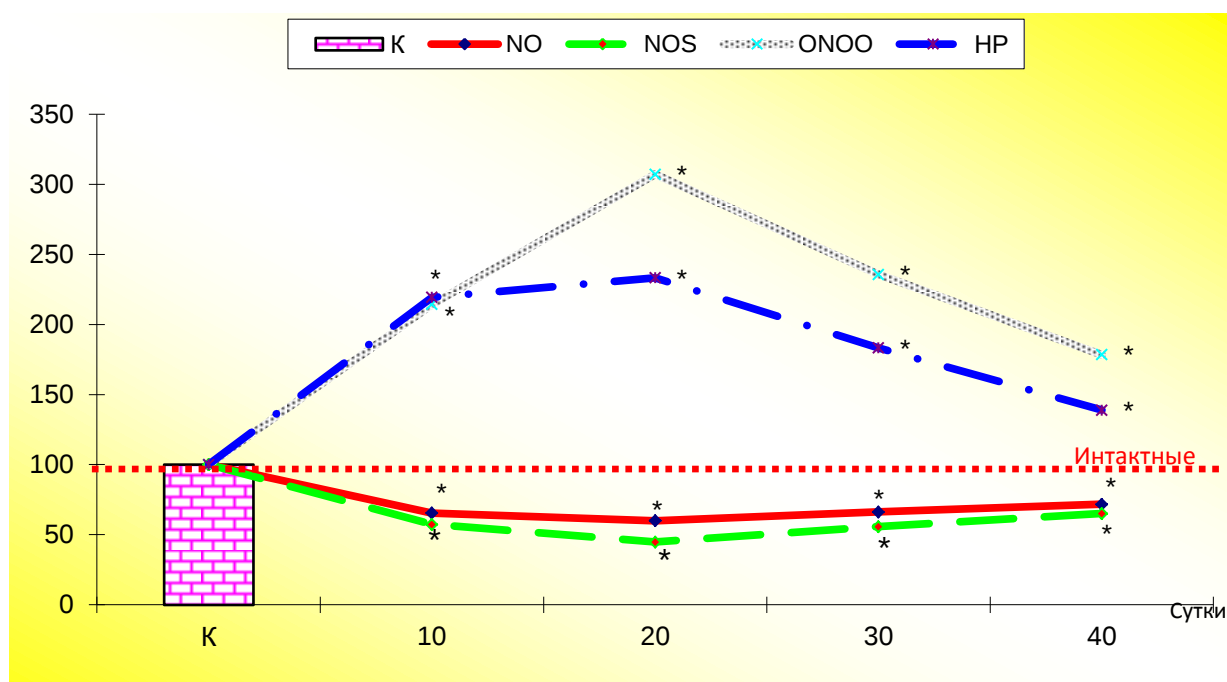


Рис. 5. Показатели NO-системы в микросомах СОЖ в различные сроки после воспроизведения ЯП. * - $P < 0,05$ по сравнению с интактными животными.

Через 20 суток регистрировалось еще более значительное уменьшение уровня NO_x и активности NOS – соответственно на 39,5 и 55,2% и увеличение активности НАДФН-зависимой HP и концентрации ONOO^- – соответственно на 133,3 и 207,1%. Через 30 суток уровень NO_x и активность NOS возрастали, оставаясь, однако, ниже, чем у интактных животных соответственно на 33,7 и 44,2%. При этом активность НАДФН-зависимой HP и уровень ONOO^- превышали контроль соответственно на 83,3 и 135,7%.

Через 40 суток наблюдалось отчетливое увеличение уровня NO_x и активности NOS, а также снижение скорости реакции фермента НАДФН-зависимой HP и содержания ONOO^- по сравнению с предыдущим сроком. При этом уровень основных стабильных метаболитов NO_x и активность NOS оставались ниже, чем у интактных животных соответственно на 28,3 и 34,9%, а активность НАДФН-зависимой HP и ONOO^- – выше на 38,9 и 78,5%.

Следовательно, в микросомах желудка после воспроизведения ЯП в NO-системе формируется дисбаланс: вследствие угнетения активности фермента NOS уменьшается образование NO_x на фоне гиперэкспрессии активности НАДФН-зависимой НР и увеличения количества ONOO^- .

Интересные данные были получены у животных после резекции желудка. На 10-е сутки после резекции в выделенной микросомальной фракции СОЖ содержание NO_x , активность NOS были ниже исходных данных (20-е сутки опыта у животных с ульцерогенезом) на 36,1 и 17,3%, а концентрация ONOO^- и активность НАДФН-зависимой НР, напротив, превышали исходные величины соответственно на 16,7 и 18,6%. К 20-м суткам после резекции содержание NO_x и активность NOS были выше исходных данных на 10,0 и 19,8%, а концентрация ONOO^- и активность НАДФН-зависимой НР, напротив, были снижены соответственно на 36,4 и 22,7%. В дальнейшем, с увеличением срока наблюдения до 30-ти суток, отмечалось существенное повышение уровня NO_x и активности NOS, которые превышали исходные значения соответственно на 50,4 и 62,2%. Что касается НАДФН-зависимой НР и концентрации ONOO^- , то они продолжали снижаться и в этот срок были ниже исходного уровня соответственно на 34,0 и 48,0% (рис. 6).

Следует отметить, что к 30-м суткам опыта все изучаемые показатели были в пределах показателей интактных животных. Следовательно, резекция желудка снижает эффекты, вызванные ЯП, которые направлены на угнетение образования эндотелиального NO, активности NOS, уменьшение высокой скорости реакции НАДФН-зависимой НР и концентрации ONOO^- .

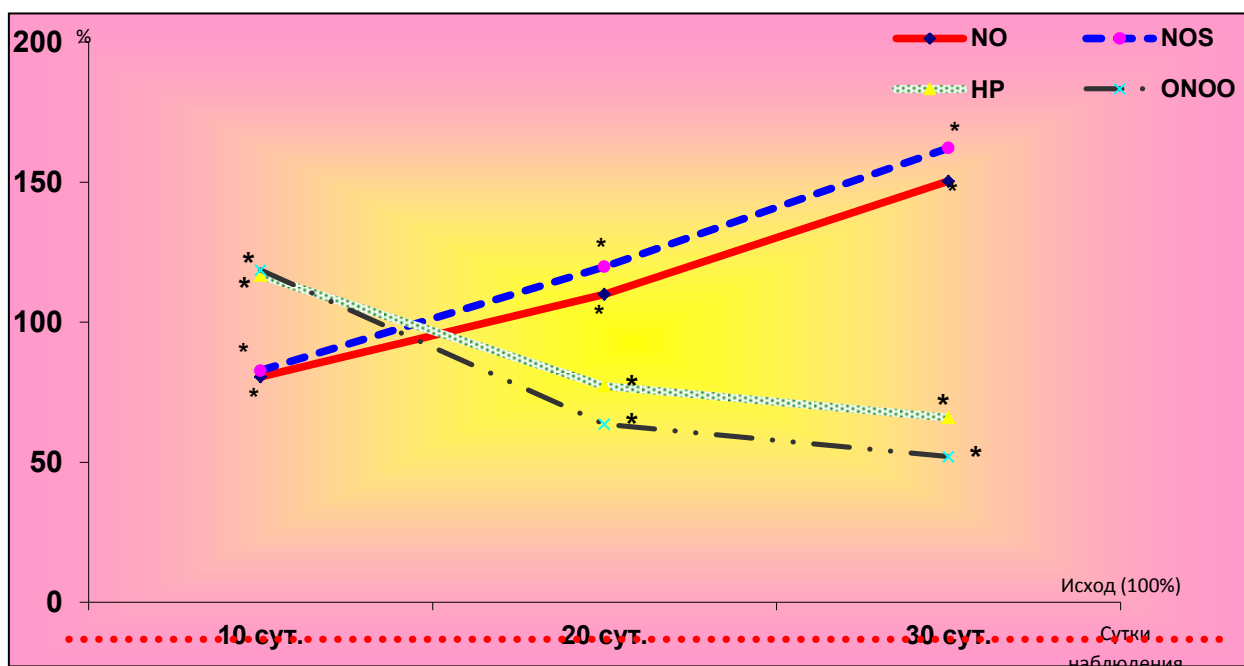


Рис. 6. Активность NO-системы в СОЖ в динамике после резекции у животных с ulcerогенезом. * - $P < 0,05$ по сравнению с исходными данными.

Совершенно неожиданные результаты были получены у животных после ваготомии. На 10-е сутки после ваготомии в микросомах СОЖ содержание метаболитов NO_x было на 38,8% ниже, чем у животных без ваготомии, активность NOS – на 23,7%. При этом ферментативная активность НАДФН-зависимой HP превышала исходные данные на 80,9%, экспрессия ONOO^- – на 23,2% (рис. 7). К 20-м суткам опыта у животных с ваготомией содержание метаболитов NO_x все еще было существенно ниже исходных значений на 21,3%, активность NOS – на 18,1%, а скорость реакции НАДФН-зависимой HP и экспрессия ONOO^- повышены соответственно на 31,8 и 21,2%. На 30-е сутки эта тенденция сохранялась: содержание метаболитов NO_x и активность NOS были снижены на 15,9 и 16,4%, а скорость реакции НАДФН-зависимой HP и экспрессия ONOO^- - повышены на 36,0 и 28,0%.

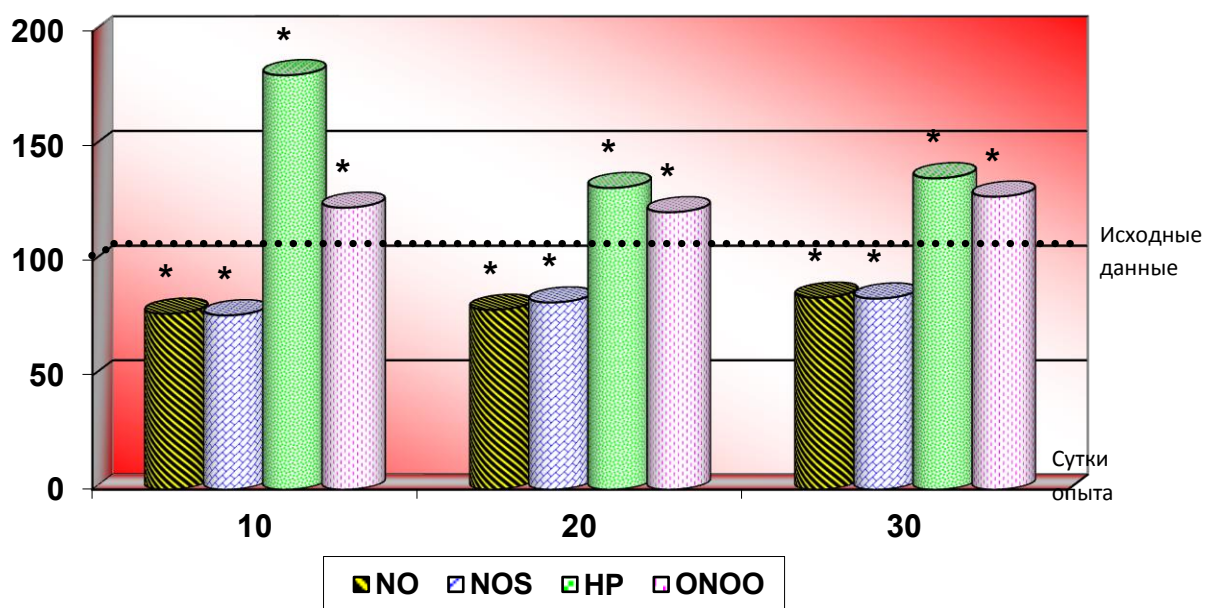


Рис. 7. Показатели NO-системы в микросомах СОЖ после ваготомии у животных с ульцерогенезом. * - $P < 0,05$ по сравнению с исходом (животные с ульцерогенезом приняты за 100%).

Следовательно, ваготомия не приводила к восстановлению до исходного уровня и уровня интактных животных показателей NO-системы в микросомах СОЖ.

Проведенные исследования показали, что снижение уровня NO_x и активности NOS, гиперэкспрессия HP и высокая концентрация ONOO^- свидетельствуют о значительном нарушении NO-системы. Выявленный дисбаланс в NO-системе желудка у животных с ЯП сохраняется до 40-х суток опыта. Максимальные нарушения в NO-системе микросомов СОЖ у животных с ЯП регистрируются на 10-е сутки опыта. Через 20, 30 и 40 суток наблюдается выраженная динамика восстановления нарушенной активности до уровня интактных животных. Все это, естественно, определило важность проведения дальнейших исследований у животных с резекций и ваготомией.

Следует отметить, что активность NO-системы в микросомах СОЖ во всех сериях опытов имела явную тенденцию к восстановлению до уровня

интактных животных. Вместе с тем резекция и ваготомия в различной степени влияли на скорость ее восстановления у животных с ЯПЖ. Из таблицы 3 видно, что резекция оказывает более выраженное позитивное действие на функциональную активность NO-системы в микросомах СОЖ, чем ваготомия. Так, через 30 суток у животных с ваготомией уровень NO был существенно ниже на 44,1%, активность NOS – на 48,5%, а активность НАДФН-зависимой НР и ONOO⁻, напротив, выше на 106,1 и 146,1%, чем у животных после резекции.

Таблица 3

Показатели NO-системы в микросомах желудка при ЯП, резекции и ваготомии, $M \pm m$

Серия	Срок опыта, сут.	NO, мкмоль/мг	NOS, мкмоль/мин/ мг	НР, мкмоль/мин/ мг	ONOO ⁻ , мкмоль/ми н/мг
Интактная		4,81±0,29	19,72±1,15	0,36±0,01	0,14±0,01
1 сер. ЯП желудка	10	3,15±0,19*	11,32±1,03*	0,79±0,03*	0,30±0,01*
	20	2,91±0,14*	8,83±0,68*	0,84±0,06*	0,43±0,03*
	30	3,19±0,20*	11,0±0,91*	0,66±0,03*	0,33±0,02*
	40	3,45±0,23*	12,84±1,07*	0,50±0,03*	0,25±0,02*
2 сер. ЯП желудка 10 сут. + резекция	10	1,86± 0,15* Δ	7,30± 0,26* ^Δ	0,98± 0,05* ^Δ	0,51± 0,03*
	20	3,51± 0,26* Δ	13,18± 1,17* Δ	0,51 ±0,03* ^Δ	0,21 ±0,02* Δ
	30	5,19±0,30 ^Δ	20,83 ±1,30 ^Δ	0,33 ±0,03 ^Δ	0,13 ±0,01 ^Δ
3 сер. ЯП желудка 10 сут.+ваго- томия	10	1,78 ±0,11* Δ	6,74 ±0,50*	1,52 ±0,06* ^Δ , □	0,53 ±0,03*
	20	2,51±0,16* ^Δ , □	9,01 ±0,83* ^Δ , □	0,87 ±0,04* ^Δ , □	0,40 ±0,03*
	30	2,90±0,20* ^Δ , □	10,73 ±1,22* ^Δ , □	0,68 ±0,03* ^Δ , □	0,32 ±0,03*

Примечание. $P < 0,05$: * - по сравнению с интактной группой; Δ - по сравнению с соответствующей группой ЯП желудка; $\square$ - по сравнению с соответствующей группой ЯП желудка 10 сут.+резекция.

Следует также отметить, что у животных как с резекцией, так и с ваготомией уровень NO_x , активность NOS, скорость реакции НАДФН-зависимой НР и концентрация ONOO^- в микросомах СОЖ на 10- и 20-е сутки опыта были нарушены больше, чем у животных с ЯП желудка.

Исходя из полученных данных, можно заключить, что одной из возможных причин осложнений в желудке у животных с резекцией и ваготомией является дисбаланс в NO-системе микросом СОЖ.

В настоящее время специалисты широко дискутируют о важности NO-системы в регуляции активности ферментных систем, лимитирующих резистентность СОЖ к действию агрессивных факторов среды [202]. К лимитирующим стресс-сенситивным системам в СОЖ относятся ферменты МОС [88,93,103]. Однако в литературе практически отсутствуют данные о связи NO-системы с монооксигеназами СОЖ при его язвенном поражении, резекции и ваготомии. Это и стало одной из задач наших исследований.

Роль оксида азота в развитии метаболического синдрома

Молекулярно-клеточные механизмы, лежащие в основе повреждения эндотелия при развитии метаболического синдрома (МС) до конца не раскрыты [37, 74]. Особое место в этой проблеме занимает вопрос о роли взаимосвязи оксида азота (NO) с компонентами, участвующими в его синтезе и распаде [105]. Важными регуляторами концентрации NO в эндотелии сосудов и потоке крови являются составляющие NO-системы (NOS) – эндотелиальная NOS (eNOS) и индуцибельная (iNOS) [102], а также градиент концентрации собственной NO и его связь с другими соединениями, в

частности, с анион-супероксидом (O_2^-) [84, 58]. Возможно, что от содержания этих компонентов во многом зависит не только уровень NO в крови, но и чувствительность рецепторных структур эндотелия сосудов, адекватность их реакций на действие различных по природе патогенных факторов, присутствующих в системном и межтканевом кровотоке. Можно также предположить, что от содержания отдельных компонентов NO-системы зависит метаболический эффект NO, степень его негативного влияния на процессы белкового, углеводного и жирового обмена. Однако активность компонентов NO-системы при развитии MC недостаточно изучена. Поэтому на кафедрах биорганической и биологической химии Ташкентской медицинской академии и Андижанского Государственного медицинского института исследовали характер активности ферментов eNOS и iNOS, экспрессии NO и ONO_2^- в сыворотке крови кроликов при формировании метаболического синдрома.

Эксперименты проведены на 40 кроликах-самцах, массой тела 2 – 3,5 (средняя масса $2,55 \pm 0,814$) кг. Метаболический синдром вызвали, ежедневно добавляя в поилку животных 5%-ный раствор сахарозы, а в корм – кристаллический холестерин в дозе 250 мг/кг массы тела. Животным подкожно вводили инсулин в дозе 0,1 ед./100 г, через день. Продолжительность эксперимента 2 месяца. Были определены 3 группы животных. Каждой из них за 10 суток до планируемого конца эксперимента ежедневно внутрибрюшинно вводили водный раствор: 1-ой - L-аргинин 50 мг/кг (Тивортін Юрія Фарм, Украина); 2-ой - неселективный ингибитор eNOS L-NAME (Mw-nitro-L-Arginin Methyl Ester; Sigma, USA) 5 мг/кг; 3-ей – селективный ингибитор индуцибельной NOS (iNOS) –S-MT (S-Methylisothiouraea; Sigma, USA) 1 мг/кг. Назначение модуляторов L-аргининового NO-синтазного окисления - L-аргинина, eNOS, iNOS позволяет определить вклад отдельных составляющих NO системы в изменение уровня NO и его соединения ONO_2^- при развитии MC. Контролем служили данные полученные от интактных (контроль 1) и животных, получавших плацебо

(животным подкожно вводили стерильную дважды дистиллированную воду), а в поилки добавляли водопроводную воду (контроль 2).

Содержание общего холестерина (ХСобщ.) определяли с помощью набора химреактивов фирмы «Берлингер Маннгейм» (Германия) на спектрофотометре СФ-46 (Россия) при λ -500 нм. Инсулинорезистентность оценивали по содержанию С-пептида, который синтезируется β -клетками поджелудочной железы и секретируется в кровь в количестве, эквивалентном инсулину. Содержание глюкозы и С-пептида определяли на биохимическом анализаторе Daytona фирмы «Randox» (Великобритания) с использованием специальных наборов и программы. Исследование проводили через 20, 40 и 60 суток от начала эксперимента.

Исследования показали, что с увеличением сроков патофизиологической модели МС в сыворотке крови животных линейно возрастает содержание глюкозы, ХСобщ. и С-пептида (табл. 4) - важных показателей, характеризующих степень нарушения углеводного и жирового обменов, снижение чувствительности тканей к инсулину – инсулинорезистентность (ИР). О снижении ИР у животных с МС свидетельствует высокий уровень аналога инсулина С-пептида – в 1,2; 1,3 и 1,2 раза выше нормы, соответственно через 20, 40 и 60 суток и глюкозы – в 2; 2,2 и 3,5 раза. Оказалось, что динамичное повышение в сыворотке крови NO ассоциируется с угнетением фермента eNOS, ускорением реакции фермента iNOS и экспрессией концентрации ONO_2^- . Можно полагать, что экспрессия NO, усиливающаяся с увеличением сроков опыта, обусловлена индукцией iNOS и увеличением концентрации ONO_2^- , так как активность eNOS была существенно снижена. Следует отметить, что гиперэкспрессия NO вследствие индукции iNOS может быть связана с увеличением содержания ONO_2^- . Его уровень возрастает в условиях гипоксии и образования

супероксид-аниона O_2^- , который окисляет NO [102, 58]. О развитии гипоксии в наших опытах свидетельствует увеличение содержания ХСобщ. при недостатке в крови молекулярного кислорода: он снижался в 1,7-2,5 раза от нормы.

Следовательно, важным фактором развития МС у экспериментальных животных является инициация NO, обусловленная индукцией iNOS, экспрессией ONO_2^- и угнетением активности eNOS.

Модулятор L-аргинина и ингибиторы мы вводили животным чтобы определить роль каждой составляющей NO-систему в развитии МС. Было установлено, что после введения L-аргинина (1-я группа) практически нормализовалось содержание глюкозы, ХСобщ. и С-пептида. Одновременно в сыворотке крови животных с МС достигли значений контроля уровень NO, активность eNOS и iNOS, содержание ONO_2^- . К концу эксперимента, т.е. уже при выраженно развивающемся МС, они были в пределах нормы. На этом основании можно сделать вывод о том, что, видимо, важным фактором развития МС у животных является недостаток L-аргинина, так как наряду с нормализацией показателей NO-системы, наблюдалось улучшение параметров, характеризующих состояние МС. Возможно, что восполнение запасов L-аргинина активизирует eNOS и вследствие этого, она эффективно утилизирует базальный уровень NO, угнетает активность iNOS и, соответственно, ONO_2^- .

Наше предположение подтверждается результатами, полученными во 2- и 3-ей группах. Во 2-ой группе блокирование в NO-системе eNOS ингибитором L-NAME характеризовалось еще большим, динамичным повышением показателей, характеризующих состояние МС у животных – гиперэкспрессией NO, ONO_2^- и iNOS (к концу эксперимента – в 10, 17 и 8 раз) на фоне 8-разового угнетения eNOS. Неселективный ингибитор также не оказал никакого влияния на содержание глюкозы, ХСобщ. и С-пептида.

При введении S-MT – селективного ингибитора iNOS отчетливо улучшались все исследуемые показатели, но не до уровня контроля, т.е. они

не нормализовались. Чтобы выяснить, за счет каких факторов в сыворотке крови животных повышается уровень глюкозы, ХСобщ. и С-пептида мы после окончания эксперимента (через 2 мес.) определили корреляционную связь между этими показателями и параметрами NO-системы. Было установлено, что в этот период показатели, характеризующие состояние МС, а также активность NO-системы максимально нарушены по сравнению с контролем. Высокие показатели NO, iNOS и ONO_2^- прямо коррелировали с высоким содержанием глюкозы, ХСобщ. и С-пептида ($r=0,84-0,88$; $P<0,001$), а сниженная активность eNOS, наоборот, имела сильную обратную корреляционную связь с глюкозой, ХСобщ и С-пептидом ($r = -0,83$; $0,81$ и $0,87$, $P<0,001$).

Корреляционная зависимость между состоянием МС и напряженностью NO-системы еще больше увеличилась у животных, которым вводили препарат L-NAME $r = 0,88-0,96$ и $r = 0,95 - 0,96$ ($P<0,001$), соответственно срокам исследования. Назначение L-аргинина и S-MT выявило обратную связь между показателями NO, iNOS и ONO_2^- ($r = -0,77-0,76$; $P<0,001$) и прямую – между eNOS ($r = 0,80-0,79$, $P<0,001$), показателями глюкозы, ХСобщ. и С-пептида.

Таким образом, мы определили важную причину развития МС – недостаток в организме животных L-аргинина. Активность eNOS, iNOS, содержание NO, ONO_2^- после препарата S-MT не только не нормализовалась, но и продолжала ухудшаться. Наибольшее нарушение этих показателей выявлено при блокировании eNOS - L-NAME. Аналог же L-аргинина на протяжении всего исследования стабильно восстанавливал все изучаемые показатели до нормы. На важность L-аргинина в механизмах регуляции обмена глюкозы, ХСобщ. и активности С-пептида указывает изменение полярности корреляционной связи между показателями NO-системы и системой развития МС – вместо ожидаемой положительной связи, которая наблюдалась у животных с МС и при назначении селективного блокатора eNOS - L-NAME, мы получили обратное значение. Можно полагать, что

снижение активности eNOS вызвано двумя факторами – снижение в организме животных содержания L-аргинина и высокая экспрессия iNOS. С другой стороны, снижение L-аргинина угнетает eNOS. Адекватной реакцией эндотелия, видимо, является запуск резервного механизма, в том числе активизация iNOS, вследствие чего накапливаются сверхвысокие концентрации NO и ONO_2^- . С последними, как показывают исследования последних лет [84, 89] связывают развитие воспалительных реакций в эндотелии сосудов, усиление их чувствительности к биологически активным соединениям, повреждение органов и систем, ответственных за гемостаз в организме.

Таким образом, в динамике формирования МС важным фактором выступает дефицит L-аргинина, что обуславливает угнетение активности eNOS, экспрессию NO, iNOS и ONO_2^- с которыми связано повышение в крови глюкозы, ХСобщ. и активизация процесса ИР.

Динамика изменения содержания оксида азота при экспериментальной гиперхолестеринемии

Атеросклероз – одно из наиболее распространенных хронических заболеваний – представляет важную медико-социальную проблему здравоохранения всех стран мира. Атеросклероз и его осложнения являются основной причиной инвалидизации и смертности населения, которая, по данным ВОЗ, составляет в высокоразвитых странах 45,6% от общего показателя [59].

Процесс развития атеросклероза довольно сложный. При этом запускается каскадный механизм метаболизма холестерина, изменение его транспортных форм. Важная роль при этом принадлежит и оксиду азота, взаимообусловленная работа которых является одним из патогенетических механизмов развития атеросклероза.

NO присутствует во внутренней среде организма и влияет на функции

сердечно-сосудистой системы. В присутствии NO угнетается синтез белка в клетке, подавляется пролиферация атипических клеток. Недостаточная продукция или ускоренный распад NO приводит к развитию атеросклероза [112].

Модель экспериментальной гиперхолестеринемии воспроизводили по методу Н.Н.Аничкова и С.С.Халатова [5] путем ежедневного введения через ротовую полость растворенного холестерина в подсолнечном масле в соотношении 0,2 г на 1 кг массы тела. Эксперименты были проведены на 48 кроликах породы Шиншилла средней массой 2,5-3,0 кг, содержащихся на стандартном режиме и лабораторном рационе питания. Контрольную группу составили 12 интактных кроликов.

Выбор данной экспериментальной модели патологического процесса обусловлен преимуществом, в частности, её хорошей воспроизводимостью, что особенно важно при изучении их функционального состояния при экспериментальной гиперхолестеринемии и атеросклерозе. О развитии экспериментальной гиперхолестеринемии судили по изменению содержания холестерина в сыворотке крови.

Через 90 дней от начала эксперимента животные были разделены на 4 группы: 1 группа – интактная (12 кроликов), которым вводили *per os* только воду по 1,0 мл/кг; 2 группа (12 кроликов) – которым продолжали введение холестерина; 3 группа (12 кроликов) вводили *per os* по 100 мг/кг гемфибразил; 4 группа – 12 кроликов, которым вводили *per os* по 50 мг/кг флатерона. Препарат вводили ежедневно в течении 2 месяцев на фоне продолжающего введения холестерина по 0,2 г/кг массы тела.

Флатерон является суммой флаваноидов, выделенная из надземной части Термопсиса очередноцветкового (*Thermopsis alterniflora* Rgl et. Schmalh) в экспериментально-технологической лаборатории института химии растительных веществ АН РУз.

В качестве препарата сравнения использован гемфибразил производства

Проведенные исследования показали (рис.8), что содержание конечного продукта оксида азота в сыворотке крови постепенно снижается. Так, на 30 день исследования уровень оксида азота снижается на 17,8% по отношению к интактной группе. В дальнейшем, на 60-й день, это снижение составило 42,8%, а в последующие сроки (120 и 150 сутки) - на 54,8 и 55,3%, соответственно, по сравнению с показателями интактных кроликов.

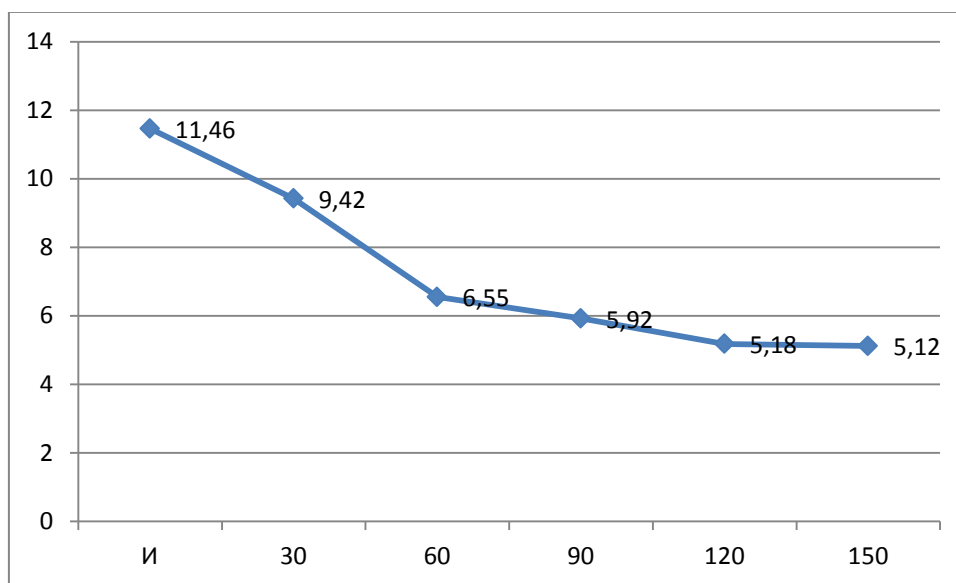


Рис. 8. Динамика изменения содержания оксида азота в сыворотке крови при развитии экспериментальной гиперхолестеринемии, мкмоль/л (n= 12)

Содержание NO в печени, аорте и сердечной мышце определили на 150 день развития гиперхолестеринемии. Выявлено существенное изменение содержания оксида азота в исследуемых органах. Полученные результаты показали, что содержание NO снижается в аорте в 2,6, печени - 3,35 и сердечной мышце - 2,91 раза по сравнению с интактными животными (рис. 9).

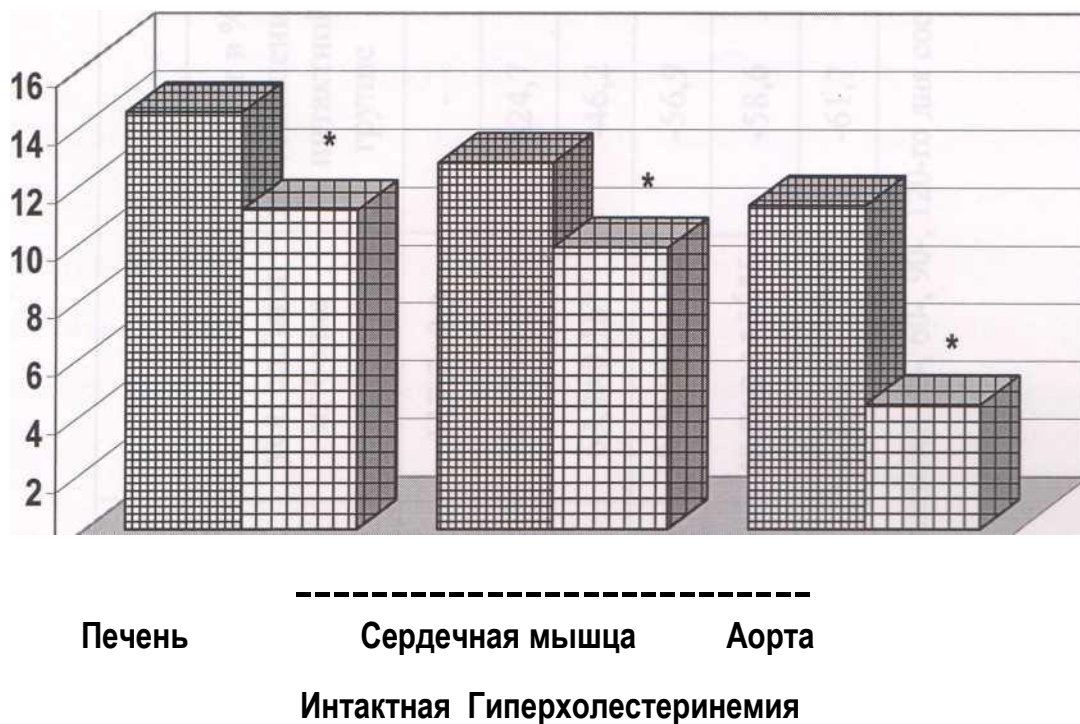


Рис. 9. Содержание оксида азота в органах при развитии экспериментальной гиперхолестеринемии, мкмоль/г (n=12)

Анализируя полученные данные можно сказать, что наблюдаемая на 60 и 90 сутки опыта активация начальных и конечных этапов распада оксида азота, видимо, приводит к еще большему ухудшению метаболических нарушений в печени, сердце и аорте экспериментальных животных.

Исследования по влиянию флатерона на продукты метаболита оксида азота в органах кроликов с экспериментальной гиперхолестеринемии показали наиболее значимый эффект флатерона на содержание метаболитов оксида азота по сравнению с гемфибрилом в сыворотке крови. Так, установлено, что гиперхолестеринемия, вызванная в течении 120 дней 2,2 раза снижает содержание метаболитов оксида азота в сыворотке крови (табл.5). Введение флатерона и гемфибрила этим животным повышает содержание оксида азота на 25,5 и 20,9% соответственно по сравнению с животными контрольной группы. Необходимо отметить, что при лечении флатероном и гемфибрилом содержание NO по сравнению с интактными животными остается пониженным на 43,4 и 45,5% соответственно.

Таблица 5

Изменение содержания оксида азота в сыворотке крови при лечении флатероном и гемфибрилом животных с экспериментальной гиперхолестеринемией, мкмоль/л ($M \pm m$, $n=12$)

Показатель	Интактная	Контрольна я	Леченая группа	
			флатероном	Гемфибразил ом
Леченные в течение 30 дней				
NO	11,46±0,01 2	5,17±0,011 ^а	6,49±0,013 ^{а, б}	6,25±0,011 ^{а,о,В}
Леченные в течение 60 дней				
NO	11,41±0,01 1	5,12±0,015 ^а	12,2±0,019 ^{а, б}	7,06±0,015 ^{а,о,В}

Примечание: Достоверное отличие $P < 0,05$: а - от интактной группы, б - от контроля, в - от показателей флатерона

Лечение флатероном и гемфибрилом в течении 60 дней приводит к более выраженному повышению содержания NO в сыворотке крови. Под влиянием флатерона содержание NO полностью нормализуется и даже на 6% выше, чем у интактных животных. Тогда как лечение в течение 60 дней гемфибрилом повышает содержание NO на 37,9% по сравнению с контрольной группой, но его значение на 38,4% остается ниже по сравнению с интактной группой и на 42% по сравнению с группой леченной флатероном.

Полученные данные свидетельствуют, что гиперхолестеринемия резко снижает содержание оксида азота на 120 и 150 дни исследования лечение препаратами способствует нормализации оксида азота. Флатерон по сравнению с гемфибрилом наиболее эффективно повышает содержание NO при лечении в течение 60 дней по сравнению с гемфибрилом.

Известно, что ацетилхолин взаимодействует с рецепторами клеток эндотелия кровеносных сосудов и приводит к образованию ЭФР, который стимулирует образование цГМФ и вызывает связывание NO с гемовой группой гуанилатциклазы. В связи с этим проводились исследования по определению

содержания NO в аорте и сердечной мышце.

Исследование содержания NO в тканях у животных с экспериментальной гиперхолестеринемией показало (табл.6), что его содержание снижается во всех исследованных органах. Наиболее выраженное снижение его содержания выявлено в аорте (61,7%), а в печени и сердечной мышце оно составляет 23,3 и 23,0% соответственно.

Таблица 6

Изменение содержания оксида азота (NO, мкмоль/г) в органах при лечении флатероном животных с экспериментальной гиперхолестеринемией, ($M \pm m$, $n=12$)

Органы	Интактная группа	Контрольная группа	Леченая группа	
			флатерон	Гемфибразил
Печень	14,36 $\pm$ 0,21	11,02 $\pm$ 0,7 ^a	14,83 $\pm$ 0,9 ^o	11,4 $\pm$ 0,6 ^{a,B}
Сердце	12,64 $\pm$ 0,43	9,73 $\pm$ 0,56 ^a	13,08 $\pm$ 0,5 ^o	10,65 $\pm$ 0,12 ^{a,B}
Аорта	11,19 $\pm$ 0,36	4,29 $\pm$ 1,29 ^a	8,7 $\pm$ 0,53 ^{a,o}	7,23 $\pm$ 0,12 ^{a,o,B}

Примечание: Достоверное отличие $P < 0,05$: а - от интактной группы, б - от контроля, в -от показателей флатерона

Лечение флатероном по сравнению с гемфибразилом приводит к повышению NO в исследованных органах. Установлена полная нормализация NO в печени и сердечной мышце при лечении флатероном (14,83 $\pm$ 0,9; 13,08 $\pm$ 0,5; 8,7 $\pm$ 0,53 мкмоль/г, соответственно).

При лечении гемфибразилом в печени и сердечной мышце содержание NO повышается, но остается ниже на 20,6 и 3,3% соответственно значений интактной группы. При лечении флатероном и гемфибразилом содержание NO в стенке аорты повышается в 2,0 и 1,7 раза соответственно по сравнению с контрольной группой, но тем не менее эти показатели не нормализуются, а остаются на 22,3 и 35,4% ниже по сравнению со значениями интактной группы (рис.10).

Полученные данные свидетельствуют о том, что при

экспериментальной гиперхолестеринемии наблюдается снижение NO в печени, сердечной мышце и, особенно, стенке аорты. Лечение флатероном способствует нормализации содержания NO в сыворотке крови, печени и сердечной мышце. В стенке аорты содержание NO повышается, но не нормализуется. Лечение гемфибрилом не приводит к нормализации содержания оксида азота в изученных органах и тканях.

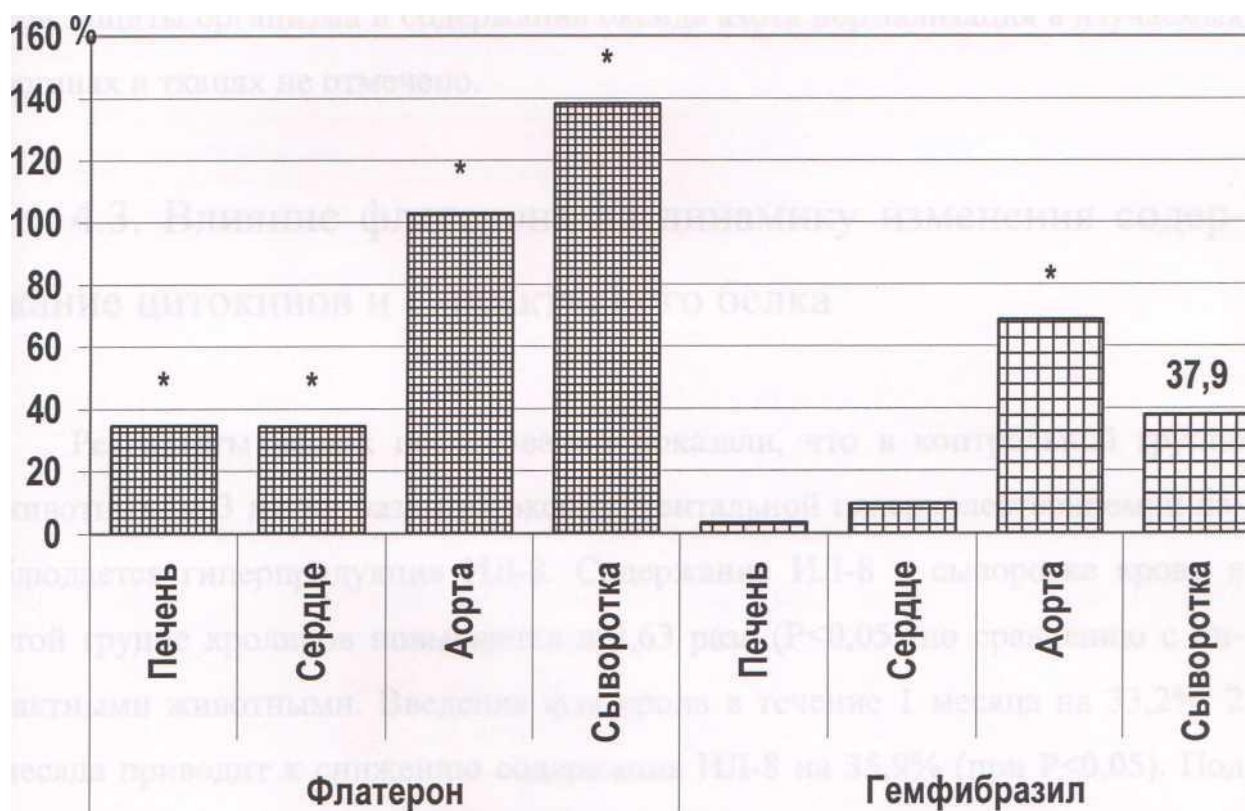


Рис.10 . Изменение метаболитов оксида азота в органах и сыворотке крови у кроликов при развитии экспериментальной гиперхолестеринемии в % по отношению к контрольной группе, ($M \pm m$, $p=12$)

Таким образом, проведенные исследования показывают, что изучаемые препараты способствуют нормализации нарушенных экспериментальной гиперхолестеринемией процессов системы оксида азота. Происходит полная нормализация содержания оксида азота в сыворотке крови, печени и сердечной мышцы. Эффективность гемфибрила менее выражена, нормализации содержания оксида азота в изученных органах и тканях не

отмечено. Полученные данные свидетельствуют о позитивном влиянии флатерона на метаболически-функциональное состояние печени, сердца и аорты, нормализуя содержание оксида азота, который позволяет глубже понять механизм его действия и является дополнительным фактором, подтверждая целесообразность использования флатерона на фоне гиперхолестеринемии.

Эти данные свидетельствуют о несомненной информативности определения NO и целесообразности использования данных показателей для дополнительной характеристики особенности течения, прогнозирования и лечения гиперхолестеринемии и атеросклероза.

Заключение

Открытие высокоактивного межклеточного посредника – оксида азота (NO) позволило прояснить многие неясные вопросы функционирования и состояния клеточного сообщества в организме человека и животных. В 1992 г. NO из-за большого интереса к нему исследователей был назван молекулой года. В 1998 г. Р. Фуршготт, Л. Игнарро и Ф. Мурад за работы по выяснению механизмов, связанных с участием NO, получили высшую оценку мировой науки – Нобелевскую премию. Однако, как это всегда бывает на пути познания, открытие порождает еще больше вопросов. Видимо, NO достаточно долго будет привлекать внимание исследователей, и можно надеяться на получение новых интересных и значимых результатов. Предпосылкой к исследованию послужили, и будут служить, большое количество данных о значительной роли молекулы оксида азота в организме человека. Возможно, в настоящее время это один из самых активно разрабатываемых вопросов в биохимии.

Молекула оксида азота, являясь короткоживущим соединением (срок жизни молекулы составляет около 10 сек.), активно участвует в процессе регуляции тонуса сосудистой системы, выполняя роль так называемого «эндотелиального релаксирующего фактора». Исследование структуры и функции эндотелия сосудов открыли совершенно новые его свойства, что способствовало разработке новых форм лекарственных средств.

Эндотелий оказался огромной эндокринной железой, вырабатывающей широкий спектр биологически активных веществ, которые участвуют во многих механизмах гомеостаза, в том числе и в регуляции местного кровотока. В физиологическом состоянии биологически активные вещества эндотелия создают условия для адекватного местного кровотока, синтезируя мощные антикоагулянты, являющиеся и вазодилататорами. Активность эндотелия в норме обеспечивает трофику органов и защиту, благодаря наличию в эндотелии высокоорганизованных механизмов саморегуляции.

При нарушении функции или структуры эндотелия резко меняется спектр выделяемых им биологически активных веществ. Он начинает секретировать агреганты, коагулянты, вазоконстрикторы, причем часть из них (ренин-ангиотензиновая система) влияет на всю сердечно-сосудистую систему. При неблагоприятных условиях (гипоксия, нарушения обмена веществ, атеросклероз и т.п.) эндотелий становится инициатором (или модулятором) многих патологических процессов в организме.

Молекулярные основы функционирования и дисфункции сосудистого эндотелия – сложны и до конца не изучены. Однако многочисленные исследования убедительно свидетельствуют о ведущей роли в этих процессах системы оксида азота. Её значение определяется, с одной стороны, многогранным участием NO в осуществлении эндотелием своих функций, с другой – возможностью коррекции возникающих нарушений, воздействуя на различные звенья этой системы.

В нашей работе мы попытались показать главные направления и достижения науки в изучении системы оксида азота, выделить основные функции, механизмы синтеза, ингибирования NO и его производных, раскрыть новейшие теории участия данного соединения в патогенезе многих заболеваний организма. Не вызывает сомнения тот факт, что система оксида азота в организме является чрезвычайно важной для поддержания гомеостаза и нормального функционирования всех без исключения систем организма.

В эксперименте было показано, что при развитии сальмонеллезной инфекции или хронического гепатита нарушаются показатели нитроергической системы в крови: повышается содержание оксида азота и пероксинитритов, активизируется iNOS, угнетается eNOS. Эти нарушения значительно усугубляются при сочетании обеих патологий. Ответные реакции инфицированного организма зависят от активности NO-синтазы, генерирующей образование молекул NO, которые с радикалом супероксидного аниона образуют высокотоксичный продукт –

пероксинитрит (ONOO^-). Он может вызывать обширную нитрацию тканей и окисление различных биохимических компонентов клеток.

При заражении *S.typhimurium* слизистой желудка и кишечника животных в соответствии со сроками заболевания увеличивается содержание оксида азота, пероксинитритов, повышается активность NO-синтазы, особенно ее индуцибельной формы. При микст-инфекции активность NO-синтаз, изменяется разнонаправлено, более выражены - на 7- и 10-е сутки эксперимента. Особенно высокое содержание пероксинитритов установлено в эти же сроки.

При ЯПЖ значительно нарушается активность NO-системы в микросомах СОЖ. Об этом свидетельствует снижение в микросомах СОЖ содержания основных стабильных метаболитов NO_x и активности eNOS, увеличение активности НАДФН-зависимой нитрат редуктазы и гиперэкспрессия ONOO^- . После моделирования ЯПЖ имеются два периода: период максимальных нарушений в NO-системе – 10- и 20-е сутки опыта и период уменьшения выраженности этих нарушений в NO-системе микросом СОЖ – 30- и 40-е сутки. К 40-м суткам показатели, характеризующие состояние активности NO-системы, статистически значимо отличаются от таковых у животных интактной группы. По-видимому, высокая активность НАДФН-зависимой нитратредуктазы является одной из наиболее важных причин гиперэкспрессии ONOO^- , снижения в микросомах СОЖ у животных с ЯПЖ уровня NO и активности eNOS.

При экспериментальной гиперхолестеринемии у кроликов установлено существенное изменение содержания оксида азота в печени, аорте и сердечной мышце, крови на 150 день развития гиперхолестеринемии. Лечение экспериментальных животных флатероном и гемфибрилом способствуют нормализации нарушенных процессов системы оксида азота. Происходит полная нормализация содержания оксида азота в сыворотке крови, печени и сердечной мышцы. Эффективность гемфибрила менее выражена, нормализации содержания оксида азота в изученных органах и

тканях не отмечено. Флатерон позитивно влияет на метаболически-функциональное состояние печени, сердца и аорты, нормализуя содержание оксида азота, подтверждает целесообразность использования флатерона на фоне гиперхолестеринемии.

Эти данные свидетельствуют о несомненной информативности определения NO и целесообразности использования данных показателей для дополнительной характеристики особенности течения, прогнозирования и лечения гиперхолестеринемии и атеросклероза.

Формирование метаболического синдрома у экспериментальных животных вызывает дисбаланс в NO-системе: увеличение в сыворотке крови содержания NO, iNOS и ONO_2^- на фоне угнетения активности эндотелиальной NOS (eNOS). Выявлена корреляционная зависимость показателей, характеризующих развитие метаболического синдрома (гипергликемия, инсулинорезистентность, гиперхолестеринемия): сильная прямая ($r > 0,8$) – от показателей дисфункции эндотелия (NO, iNOS и ONO_2^-) и сильная обратная ($r > -0,8$) – от снижения активности eNOS. В механизмах нарушения NO-системы важное место занимает дефицит L-аргинина. Восполнение запасов L-аргинина прекращает дальнейшее формирование метаболического синдрома у экспериментальных животных, нормализует в сыворотке крови содержание глюкозы, общего холестерина, С-пептида, а также исходно нарушенные показатели эндотелия – уровень NO, eNOS, iNOS и ONO_2^- .

Итак, современный научный мир активно занимается проблемой оксида азота, постоянно появляются новые данные о его участии до сих пор непознанных разделах медицины. Но остается еще множество вопросов, на которые предстоит ответить. Значение оксида азота и необходимость коррекции его метаболизма у больных различной патологией не представляет сомнений. Мы надеемся, что представленная информация позволит читателю максимально глубоко оценить и понять всю многогранность и важность функционирования системы оксида азота в организме.

Выводы:

1. Экспериментально доказано, что при заражении животных сальмонеллезной инфекцией (*S.typhimurium*) или гелиотрином в организме животных происходит синдром эндогенной интоксикации, высокая пролиферация эпителия в слизистой оболочки желудка и кишечника, в основе которых лежат процессы дисфункции эндотелия.
2. Главная причина его возникновения – инфекция вызывает дисбаланс в системе оксида азота: в слизистой желудка и кишечника и сыворотке крови увеличивается содержание NO, пероксинитритов (ONOO^-), активности индуцибельной формы NO-синтазы (iNOS) и угнетается – эндотелиальная (eNOS). Вследствие этого высокотоксичный пероксинитрит вызывает обширную нитрацию тканей и окисляет структурные компоненты клетки.
3. Особенно сильно дисфункция эндотелия выявляется при микст инфекции (сальмонеллез на фоне гелиотринового гепатита) и на 7- и 10-е сутки эксперимента.
4. У животных с гастродуоденальной язвой после резекции и ваготомии в микросомах СОЖ желудка установлена неоднозначная динамика нарушений активности нитрергической системы. На 10-е сутки после резекции показатели характеризующие состояние нитрергической системы – концентрация основных стабильных метаболитов $\text{NO}(\text{NO}_x)$, активность NOS снижались, а скорость реакции нитрат редуктазы и уровень ONOO^- увеличивались. К 30-м суткам изучаемые показатели восстанавливались до уровня интактных животных. После ваготомии содержание NO_x , активность NOS, уровень HP и концентрация ONOO^- к 10-м суткам опыта имели некоторую тенденцию к улучшению, но значительно

отличались ($P < 0,01$) от значений, выявляемых у крыс с ЯПЖ и интактных животных.

5. Выраженность показателей метаболического синдрома, гиперхолестеринемии (гипергликемия, инсулинорезистентность, гиперхолестеринемия) прямо зависит от степени нарушения показателей NO, iNOS, ONOO⁻ и eNOS.
6. В механизме нарушения NO-системы важное место занимает дефицит L-аргинина.
7. Восполнение запасов L-аргинина останавливает формирование метаболического синдрома у экспериментальных животных, нормализует в сыворотке крови содержание глюкозы, ХСобщ., С-пептида, а также исходно нарушенные показатели эндотелия – содержание NO, eNOS, iNOS и ONO₂⁻.

Библиографический указатель

1. Абдуллаев Н. Х., Клейнер С. И., Рузибакиев Р. М. Влияние различных пестицидов на функциональное состояние печени в зависимости от длительности их воздействия // Мед. журн. Узбекистана. - 1985. - №7. - С. 45-47.(1)
2. Абдурахманов Д.Т. Хронический гепатит В и D.//М.-Изд. «ГЭОТАР-Медиа».-2010.-286 С.(2)
3. Акмаев И.Г., Гриневич В.В. Нейроиммуноэндокринология гипоталамуса. – М.: Медицина, 2003. – 168 с.(3)
4. Алимова Л.А., Нигматов Н.Н. Значение токсико-инфекционных заболеваний кишечника в развитии гепатитов и циррозов /Тез. научн-практ.- конф. «Детская гастроэнтерология: современное состояние и перспективы». - Ташкент, 2003.-С.49.(4)
5. Аничков Н.Н., Халатов С.С. Новые данные по вопросу о патологии и этиологии атеросклероза//Рус.врач.-1913.-№8.-С.184-186.
6. Арзамасцев А.П., Северина И.С., Григорьев Н.Б., Граник В.Г. Экзогенные доноры оксида азота и ингибиторы NO-синтеза. //Вестн. РАМН 2003; 12: 88-95.
7. Аронов Д.М. Лечение и практика атеросклероза. – М.: Триада-Х, 2000.- 134с.
8. Арутюнов Г.П. Статины и острые коронарные синдромы. Мы на пороге нового стандарта лечения // Клин. фармакол. и терапия. – 2001. – Т.3. №10.
9. Арушанян Э.Б., Бейер Э.В. Взаимосвязь психоэмоционального состояния и иммунной системы // Успехи физиол. наук. – 2004. – Т. 35. – С. 49-64.
10. Белоусов Ю.Б. Дженерики – мифы и реалии // Remedium, 2003.- № 7– 8.- С. 4-9.

11. Беляевский А.Д., Тараканов А.В., Милютин Н.П. и соавт. Глутаматиндуцированная нейротоксичность оксида азота и ее коррекция бемитилом при геморрагическом инсульте www.medi.ru.
12. Беридзе М.З., Урушадзе И.Т., Шакаришвили Р.Р. Механизмы отсроченной гибели нейронов при острой церебральной ишемии в эксперименте //Журн. Неврол. и психиатрии им. С.С. Корсакова. Инсульт (приложение), 2001.-3: 35-40.
13. Болезни нервной системы (4-е изд.) / под ред. Н.Н. Яхно, Д.Р. Штульмана. М.: Медицина, 2005.-231с.
14. Болезни печени и желчевыводящих путей. Рук-во для врачей /А. О. Буеверов, В. Б. Золотаревский, В. Т. Ивашкин и др. ; под ред. В. Т. Ивашкина и др., 2002. - 432 с.(13)
15. Бувальцев В.И. Дисфункция эндотелия как новая концепция профилактики и лечения сердечно-сосудистых заболеваний // Межд. Мед. журнал, 2001.- №3.-С.12-15.
16. Ванин А.Ф. Оксид азота в биомедицинских исследованиях // Вестн. Росс. АМН. – 2000. – № 4. – С. 3-5.
17. Васильева Е.М., Баканов М.И., Марков Х.М. Влияние L-аргинина и L-NAME на активность АТФаз и перекисное окисление липидов в эритроцитах детей с церебральными параличами. В кн.: Роль монооксида азота в процессах жизнедеятельности. Минск ,1998; 182-185.
18. Васильева Е.М., Марков Х.М., Баканов М.И. Влияние системы L-аргинина-оксид азота на активность АТФаз и перекисное окисление липидов в эритроцитах детей с астматическим бронхитом// Бюлл. экспер. биол., 1999; 3: 340-343.
19. Верещагин Е.И., Тарасов Р.С., Астраков С.В., Волков С.Г. Нейропротекция кетаминот и допаминсберегающими препаратами в остром периоде черепно-мозговой травмы и терапии апаллического синдрома. //Анестезиол. и реаниматол. – 2004. – №4. – С.47-51.

20. Вертелкин В.А., Голофеевский В.Ю., Стефанюк Н.Ф., Салтыков А.А. Криогенный способ формирования экспериментальной язвы желудка // Пат. физ. -1987. -№ 2. -С. 77-78.
21. Виничук С.М., Черенко Т.М. Ишемический инсульт: эволюция взглядов на стратегию лечения. Изд-во ООО «Комполис», Киев, 2003.- 120 с.
22. Виноградов Н.А. Антимикробные свойства окиси азота и регуляция ее биосинтеза в макроорганизме// Антибиотики и химиотерапия –1998 – №43; 2 – С.24-29.
23. Волошин П.В., Малахов В.О. Клітинно-мембранна дисфункція – вузловий патогенетичний механізм початкових стадій хронічних церебральних ішемій. //Укр. вісник психоневрології, 2003.-11(3): 5-8.(21)
24. Волошин П.В., Воробева Т.М., Гейко В.В. Концепція ролі імунонейроендокринної ланки в етіопатогенезі сучасних форм нервової та психічної патології // Укр. вісник психоневрології. – 2006. – Т. 14, вип. 3 (48). – С. 5-9.
25. Волошин Л.В., Малахов В.А., Завгородняя А.Н. Эндометриальная дисфункция при цереброваскулярной патологии. –Харьков. 2006. – С.92.
26. Ганнушкина И.В., Коплик Е.В., Конорова И.Л. и соавт. Индивидуальная чувствительность к ишемии мозга и негативное влияние эмоционального стресса на ее течение // Бюлл. exper. биол. и мед. – 2004. – Вып. 137, №2. – С. 124-127.
27. Гарбузенко Д.В. Роль микрофлоры кишечника в развитии осложнений портальной гипертензии при циррозе печени//Клин.мед.-2007.-№8.-С.15-19.
28. Гариб Ф.Ю., Ризопулу А.П. Взаимодействия патогенных бактерий с врожденными иммунными реакциями хозяина//Инфекция, фармакология и иммунитет.- 2012.- Т. 2, № 3- С. 581–596.

29. Гиляревский С.Р. Применение нитратов при лечении сердечно-сосудистых заболеваний: роль изосорбида мононитрата // Журн. «Трудный пациент». – 2006. – № 11. – С.45-47.
30. Гоженко А.И., Насибуллин Б.А., Кохно Ю.С. Активность NO-синтазы слизистой оболочки желудка при язвенной болезни двенадцатиперстной кишки // Вестн. Росс. АМН. – 2000. – № 7. – С. 8-10.
31. Голиков П.П., Николаева Н.Ю., Гавриленко И.А. Оксид азота и перекисное окисление липидов как факторы эндогенной интоксикации при неотложных состояниях // Пат. физ. и эксп. тер. -2000. -№2. –С.6-9.
32. Голиков П.П., Николаева Н.Ю., Гавриленко И.А. и соавт. Оксид азота и перекисное окисление липидов как факторы эндогенной интоксикации при неотложных состояниях // Бюлл. экспер. биол. мед. – 2000. – № 7. – С. 6-9.
33. Голубев В.Л., Левин Я.И., Вейн А.М. Болезнь Паркинсона и синдром паркинсонизма. – М: МЕДпресс, 2000. – 416 с.
34. Гриневич В.В., Акмаев И.Г., Волкова О.В. Основы взаимодействия нервной, эндокринной и иммунной систем. – СПб.: Symposium, 2004. – 159 с.
35. Дамулин И.В. Значение сосудистых нарушений в патогенезе болезни Альцгеймера у пожилых // Лечащий врач.- 2002. № 12. -С.72-76.
36. Дамулин И.В. Когнитивные нарушения сосудистого генеза: клинические и терапевтические аспекты // Журн. «Трудный пациент» 2006.- №7-23-25.
37. Джериева И.С., Волкова Н.И., Рапопорт С.И. Мелатонин и метаболический синдром: существует ли связь //Тер.арх.-2012.-№10.- С.109-112.
38. Драпкина О.М., Задорожная О.О., Ивашкин В.Т. и соавт. Особенности синтеза оксида азота у больных инфарктом миокарда // Клин. мед. – 2000. – Т. 78, № 3. – С. 19-23.

39. Евсеев В.А., Миковская О.И. Нейроиммунопатология: иммуноагрессия, дизрегуляция, перспективы адаптивной иммунотерапии // Журн. неврол. и психиатр. им. С.С. Корсакова. – 2002. – Т. 102, №5. – С. 60-64.
40. Журавлева И.А., Мелентьев И.А., Виноградов Н.А. Роль окиси азота в кардиологии и гастроэнтерологии // Клин. мед. – 1997. – № 4. – С. 18-21.
41. Затейщикова А.А., Затейщиков Д.А. Эндотелиальная регуляция сосудистого тонуса: методы исследования и клиническое значение. //Кардиология, 1998, 9: 68-80.
42. Захаров В.В., Яхно Н.Н. Нарушения памяти. М.: Геотар-Мед, 2003.- 160 с.
43. Ивашкин В. Т., Драпкина О. М. Оксид азота в регуляции функциональной активности физиологических систем // Рос. журн. гастроэнтерол., гепатолог. и колопроктол. – 2000. – № 4. – С. 16–21.
44. Изменение метаболизма оксида азота при хронической обструктивной болезни легких в сочетании с хронической ишемией головного мозга. /Соодаева С.К., Климанов И.А., Ли Т.В. и др.//Пульмонология, 2012.- Вып.1.-С.56-58.
45. Исаева Н.В., Павроз К.А., Гальбрайт Р.Б., Трясолобова М.А. Риск возникновения циррозов печени и наступления летальных исходов при вирусных гепатитах смешанной этиологии//Эпид. и инфекц.болезни.- 2013.-№4.-С.50-52.
46. Калусев А.В., К.О. Еремин, Туохимаа П. Механизмы нейропротекторного действия витамина Д3 // Вестник биологической психиатрии (Электронный бюллетень Российского общества биопсихиатрии и Украинского общества биологической психиатрии), 2004.-№ 3, <http://www.rmj.ru/index.htm>.
47. Кириченко А.А., Новичкова Ю.Н., Никулина Ж.С. и соавт Влияние терапии ливалиом на сердечно-сосудистую систему и липидный спектр крови в постменопаузе. //Русс. мед. журн., 2001.- Т. 9, № 9 (128).-С. 377-381.

48. Косаговская И.И., Волчкова Е.В. Медико-социальные аспекты вирусных гепатитов С парентеральным путем передачи//эпид. и инфек.болезни.- 2013.-№1.-С.28-39.
49. Константинова Т.С. Протекторная и нейротоксическая роль оксида азота в моделях зрительных нервов. Автореф. дисс. канд. биол. наук.- М., – 2009.-24с.
50. Крыжановский Г.Н. Дизрегуляторная патология: рук-во для врачей и биологов. – М.: Медицина, 2002. – 631 с.
51. Кульманова М.У., Сабирова Р.А., Милушева Р.Ю. Изменение состава слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта при хроническом гелиотриновом гепатите и его коррекция хитозаном// Мед. журн. Узб. - 2008. - №5. - С. 84-87.
52. Кухарчук В.В., Бубнова М.Г., Кательницкая Л.И. и соавт. Эффективность и безопасность симвастатина у пациентов с гиперхолестеринемией (результаты многоцентрового клинического исследования) // Кардиология. 2003. -№ 5(43). -С. 42-47.
53. Ларионова Н.П., Самосудова Н.В., Реутов В.П., Чайлахян Л.М. Сравнительное исследование изменений структуры молекулярного слоя мозжечка лягушки *Rana temporaria* под влиянием L-глутамата и NO-генерирующего соединения. //ДАН, 1999.-Т. 369, № 6.-С. 836-840.
54. Левенцова А.Е., макаров В.К. Сывороточные фосфолипиды в дифференциальной диагностике острого алкогольного и сальмонеллезного гастроэнтеритов//Клин.мед.-2013.-№4.-С.56-58.
55. Липовецкий Б.М. Клиническая липидология. – СПб: Наука, 2000.-254с.
56. Лишневская В.Ю. Эндотелиальная функция и возраст.//Врачебная практика, 2003;- 4: 5-10.
57. Лукянчук В.Д., Савченкова Л.В., Бібік О.Ю. Окисний гомеостаз мозку при ішемії і досвід експериментальної фармакотерапії.//Журн. АМН України, 2001.-№4.-С.647-659.

58. Лукьянова Л.Д. Современные проблемы адаптации к гипоксии. Сигнальные механизмы и их роль в системной регуляции //Пат.физиол.-2011.-№1.-С.3-19.
59. Лысикова С.Л., Погожева А.В., Акользина С.Е. и др. Эффективность антиатерогенной диеты, содержащей флаваноиды, у больных сердечно-сосудистыми заболеваниями//Вопросы питания.-2003.-№3.-С.8-11.
60. Лямиш Н.П., Сенгихин В.И., Подкидышев Д.А., Манухина Е.Б. Нарушение продукции NO у мужчин молодого возраста с артериальной гипертензией и немедикаментозный метод ее коррекции. //Кардиология, 2001;9:17-21.
61. Малахов В.О. Початкові стадії хронічних церебральних ішемій (патогенез, клініка, лікування, профілактика). Харків, 2004.- 228 с.
62. Малышев И.Ю., Манухина Е.Б. Стресс, адаптация и оксид азота // Биохимия. – 1998. - Т. 63. - № 7. - С. 992 - 1006.
63. Манухина Е.Б., Малышев И.Ю., Архипенко Ю.В. Оксид азота в сердечнососудистой системе: роль в адаптационной защите // Вестн. Рос. АМН. – 2000. – № 4. – С. 16-21.
64. Манухина Е.Б., Машина С.Ю. и соавт. Может ли адаптация к гипоксии помочь в борьбе с болезнью Альцгеймера? // Нур. Med. J. 2004. -Т. 12, N 1-2. -С. 2-14.
65. Марков Х.М. Оксид азота и оксид углерода - новый класс сигнальных молекул. //Успехи физиол наук, 1996; 4: 30-43.
66. Марков Х.М. Роль оксида азота в патогенезе болезней детского возраста /Росс. вестн. перинатол. и педиатрии, 2000.-№4.-С.43-47.
67. Марков Х.М. Оксид азота и сердечно-сосудистая система.//Успехи физиол. Наук, 2001; 32:3:49-65.
68. Марков Х.М., Надирашвили С.А. Возрастные особенности коронарных эффектов оксида азота. //Росс. вестн. педиатр. 2004;4:13-15.
69. Марков Х.М. L-аргинин – оксид азота в терапии болезней сердца и сосудов.// Кардиология, 2005; 6:87-95.

70. Марцевич С.Ю. Современные взгляды на терапию нитратами больных ишемической болезнью сердца // Сердце: журнал для практикующих врачей. 2003. № 2(8). С. 88-90.
71. Машина С. Ю., Александрии В. В., Горячева А. В. и соавт. Адаптация к гипоксии предупреждает нарушения мозгового кровообращения при нейродегенеративном повреждении: роль оксида азота. //Бюлл. экспер. биол. 2006; 142 (8): 132-135.
72. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Реутов В.П. Оксид азота и NO-синтазы в организме млекопитающих при различных физиологических состояниях // Биохимия - 2000 - Т. 65, Вып.4 - С. 485 - 503.
73. Минумчю Е. Б., Пшенникова М. Г., Горячева А. В. и соавт. Нефармакологическая профилактика нарушений мозгового кровообращения при экспериментальной болезни Альцгеймера. В кн.: Сидоренко Г. И., Солодков А. П., Шебеко В. И. (ред.) Дисфункция эндотелия. Витебск: ВГМУ; 2006. 26-31.
74. Митрофанов И.М., Селятицкая В.Г., Николаев Ю.А., Лутов Ю.В. Распространение метаболического синдрома в организованной популяции//Клин.мед.-2012.-№11.-С.47-50.
75. Мотавкин П.А., Шуматова Т.А., Андреева Н.А., Тиханский С.Н. Образование оксида азота нормальными и поврежденными нейронами узлового ганглия и дорсального ядра блуждающего нерва // Цитология. – 2000. – № 2. – С. 172-175.
76. Невзорова В.А., Зуга М.В., Гельцер Б.И. Роль окиси азота в регуляции легочных функций // Терапевт. арх. – 1997. – N 3. – С. 68-73.
77. Общая заболеваемость взрослого населения (18 лет и старше) по классам болезней за 2000–2004 г.г. в Российской Федерации // Мин-во здравоохранения и социального развития РФ / http://www.mzsrrf.ru/inf_cur/155.html.
78. Оксид азота и интерлейкины при хронических болезнях верхних отделов пищеварительного тракта у детей /Кирнус Н.И., Смирнов И.Е.,

- Кучеренко А.Г., Артамонов Р.Г., //Матер. VIII конгресса молодых ученых и специалистов «Наука о человеке» Под ред. Л.М. Огородовой, Л.В. Капилевича. – Томск: СибГМУ. – 2007. –С.80.
79. Осипов А.Н., Борисенко Г.Г., Казаринов К.Д., Владимиров Ю.А. Оксид азота, гемоглобин и лазерное облучение // Вестн. Росс. АМН. – 2000. – № 4. – С. 48-52.
80. Павелкина В.Ф., Альмяшева Р.З., Ускова Ю.Г. Применение реасиберина для коррекции синдрома эндогенной интоксикации при сальмонеллезе//Клин.мед.-2012.-№12.-С.60-64.
81. Панкин В.З., Тихазе А.К., Беленков Ю.Н. Свободнорадикальные процессы при заболеваниях сердечно-сосудистой системы. //Кардиология, 2000; 7:48-61.
82. Панченко Л.Ф., Пирожков С.В., Теребилина Н.Н. и др. Механизмы антиэндотоксиновой защиты печени//Пат.физ. и эксп.тер.-2012.-2012.- С.62-69.
83. Пинегин Б.В. Современные представления о физиологии фагоцитарного процесса. //Аллергия, астма и клиническая иммунология, 2000; 8(57): 65.
84. Покровский В.И., Виноградов Н.А. Оксид азота, его физиологические и патофизиологические свойства//Тер.арх.-2005.-№1.-С.82-87.
85. Полетаев А.Б., Морозов С.Г., Ковалев И.В. Регуляторная метасистема. Иммунонейроэндокринная регуляция гомеостаза. М.: Медицина, 2002. – 168 с.
86. Попелянский Я.Ю. Позвоночный остеохондроз – болезнь антигравитационного приспособления взрослого (постхордального) человека // Журн. невропатол. и психиатр. им. Корсакова. 2000. -№7. -С. 65-66.
87. Проскурянов С.Я., Конопляников А.Г., Иванников А.И., Скворцов В.Г. Биология окиси азота. //Мед. радиол. научный центр РАМН, Обнинск, 1999.-С.67-71.

88. Пшенникова М.Г. Роль генетических особенностей организма в устойчивости к повреждающим воздействиям и в защитных эффектах адаптации//Пат.физиол и эксп.тер.-2011.-№4.-С.7-16.
89. Раваева М.Ю., Чуян Е.Н. Изменение активности синтеза оксида азота под действием низкоинтенсивного миллиметрового излучения //Серия «Биология, химия».-2011.-Т.24 (63), №4.-С.200-210.
90. Роль оксида азота в особенностях клинических проявлений рассеянного склероза / О.А. Тенина, Л.И. Рейхерт, С.М. Быченко, О.А. Кичерова, О.Л. Маркина //Матер. IV терапевтического форума «Актуальные вопросы диагностики, лечения и профилактики наиболее распространенных заболеваний внутренних органов», Тюмень, 2005. – С. 75.
91. Роль окислительного стресса в механизмах формирования демиелинизирующего процесса при рассеянном склерозе / Л.И. Рейхерт, С.М. Быченко, О.А. Кичерова, И.Д. Подлужская, О.А. Тенина, А.А. Соколова // Журн. «Неврологический вестник им. Бехтерева»,2006.- – Т.XXXVIII.- Вып. 3-4. –С. 40-45.
92. Ремизова М.И. Роль оксида азота в норме и при патологии // Вестн. Службы крови России. – 2000. – № 2. – С. 53-57.
93. Российские рекомендации «Диагностика и коррекция нарушений липидного обмена с целью профилактики и лечения атеросклероза», Секция атеросклероза ВНОК // Кардиоваскулярная терапия и профилактика, 2004. -№ 2 (приложение). -36 с.
94. Рудакова А.В. Нужны ли статины в стационарах? Фармакоэкономический аспект проблемы // Атмосфера. Кардиология, 2004.- № 1.-С.41-46.
95. Салей А.П., Рецкий М.И. Роль оксида азота в формировании мотивационного поведения и обучения //Вестн. ВГУ. Серия: химия, биология, фармация. – 2003. – №1. – С. 75-80.

96. Смирин Б. В., Покидышев Д. А., Малышев И. Ю. и соавт. Депонирование оксида азота как фактор адаптационной защиты.// Росс. физиол. журн., 2000; 86 (4): 447—454.
97. Смирин Б. В., Малышев И. Ю. и соавт. Депонирование оксида азота в сердечно-сосудистой системе. М.: РАН. Сер. биол., 2002; 5: 585-596.
98. Скворцова В.И. Ишемический инсульт: патогенез ишемии, терапевтические подходы.// Неврол журн, 2001.- № 3.-С.67-69.
99. Смердова Л.Н, Шандренко С.Г., Дмитренко М.П. //Совр. пробл. токсикологии. – 2002. – № 4.-С.32-34.
100. Сомова Л.М., Плехова Н.Г. Оксид азота как медиатор воспаления // Вестн. ДВО РАН. – 2006. – №6. – С. 7-80.
101. Сосунов А.А. Оксид азота как межклеточный посредник // Соровский образовательный журн. – 2000. – Т.6. – С. 27-34.
102. Стародубцева М.Н. Пероксинитрит в физиологии и патологии клеток крови. М.: Медицина.-2011.-200с.
103. Стокле Ж.К., Мюлле Б., Андрианцитохайна Р., Клещев А. Гиперпродукция оксида азота в патофизиологии кровеносных сосудов. //Биохимия, 1998; 63 (7): 976-83.
104. Сумбаев В.В., Ясинская И.М. Влияние ДДТ на активность синтазы оксида азота в печени, легких и головном мозге крыс// Совр. пробл. токсикол. -2000. -№3. –С. 3-7.
105. Тепляков А.Т., Болотская Л.А., Вдовина Т.В. и соавт. Особенности клинико-иммунологических нарушений у больных ишемической болезнью сердца, сочетающейся с метаболическим синдромом, и модулирующее влияние небивалола для их коррекции//Тер.арх.-2008.- №12.-С.44-52.
106. Тимошин С.С., Боровская Т.Ф., Мокрецова Е.В. Характеристика процессов пролиферации эпителия слизистой оболочки толстой кишки в остром периоде сальмонеллеза//Арх.патол.-2001.-№1.-С.15-18.

107. Турнаев К. Т. Реактивные формы кислорода и регулы и экспрессии генов.// Биохимия, 2002; 67 (3): 281—292.
108. Хаитов Р.М., Игнатъева Г.А., Сидорович И.Г. Иммунология. М.: Медицина, 2000.-432с.
109. Хаценко О. Взаимодействие оксида азота и цитохрома Р-450 в печени // Биохимия. – 1998. – Т. 63, вып. 7. – С. 984-991.
110. Херман В.М., Бон-Щлчевский В.Дж., Кунту Г. Инфузионная терапия актовегином у пациентов с первичной дегенеративной деменцией типа Альцгеймера и мульти-инфарктной деменцией (результаты проспективного плацебоконтролируемого двойного слепого исследования у пациентов, находящихся в условиях стационара) // РМЖ, 2002. -Т. 10, № 15.- С. 658-663.
111. Шевченко О.П., Шевченко А.О. Статины ингибиторы ГМГ-КоА-редуктазы. – Москва: Реафарм, 2003.-89с.
112. Шевченко О.П., Шевченко О.А. Статины ингибиторы ГМГ-редуктазы.- Москва: Реафарм.-2003.-С.112.
113. Ширяева А.П., Байдюк Е.В., Аркадьева А.В. и др. Состояние дыхательной цепи митохондрий печени крыс с экспериментальным токсическим гепатитом//Цитология.-2007.-Т.49.-№2.-С.125-132.
114. Яхно Н.Н., Лавров А.Ю. Изменения центральной нервной системы при старении // Нейродегенеративные болезни и старение (рук-во для врачей) под ред. И.А. Завалишина, Н.Н. Яхно, С.И. Гавриловой. М., 2001. -С. 242-261.
115. 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; 32515-32518.
116. Abu-Soud H. M., Wang J., Rousseau D. L. et al. Neuronal nitric oxide synthase self-inactivates by forming a ferrous-nitric complex during aerobic catalysis. //J. Biol. Chem., 1995.-С.-2299-2306.

117. Ahonen M., Amici S., Reed B., Mungas D. et al. Mild cognitive impairment with and without lacunes // 2nd Congress of the International Society for Vascular Behavioural and Cognitive Disorders (Vas-Cog). Abstract book. Florence, 2005. -P. 21.
118. Almeda J., galhenage S., Yu J. et.al. Gut flora and lacterial trauglocation.- 2006.-Vol12(10).-P.1493-1502.
119. Auchus A., Chen C. Vascular MCI: exploratory experience with definition and course // 2nd Congress of the International Society for Vascular Behavioural and Cognitive Disorders (Vas-Cog). Abstract book. Florence, 2005. P.- 26.
120. Auer J., Berent R., Mayr H. Antiischemia effect of estrogens [Article in German] //Kardiol 2000, May; 89(5):434-41.
121. Ballard C., Rowan E., Stephens S. et al. Prospective follow-up study between 3 and 15 months after stroke: Improvements and decline in cognitive function among dementia-free stroke survivors >75 years of age // Stroke. 2003. Vol. 34. P. -2440-2444.
122. Ballou D.P., Zhao Y., Brandish P.E., Marietta M.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2002. – Vol.-99, N 19. – P. 12097-12101.
123. Barker W.W., Luis C.A., Kashuba A. et al. Relative frequencies of Alzheimer disease, Lewy body, vascular and frontotemporal dementia, and hippocampal sclerosis in the State of Florida Brain Bank //Alzheimer Dis Assoc Disord. 2002. Vol.16.- P. 203–212.
124. Bemiss C.J., Mahon B.D., Henry A. et al.// Arch. Biochem. Biophys.,2002, 402, 249-254.
125. Boet R., Mee E. //Neurosurgery, 2000 Sep; 47(3):602-6; discussion 606-7.
126. Boh M., Opolski G., Poredos P. et al. Equivalent effect of the generic and the reference atorvastatin on the modifiable factors composing the calculated absolute coronary risk. //75th Congress of European Atherosclerosis Society Prague, 2005.-P. 23–24.

127. Brown J., Bianco J.I., McGrath J.J. and Eyles D.W. // *Neurosci Lett.*, 2003;343, 139-143
128. Choi B. M., Pae H. O., Chung H. T. Nitric oxide priming protects nitric oxide-mediated apoptosis via heme oxygenase-1 induction. // *Free Radic. Biol. Med.*, 2003; 34: 1136—1145.
129. *Consequences of Trauma, Shock and Sepsis*. Munich, 2000. Ed: E.Faist, – P.243-248.
130. Cooke J.P. Does ADMA cause endothelial dysfunction. // *Arterioscler Thromb Vase Biol* 2002; 20:2032-2045.
131. Cornwell T.L., Ceaser E.K, Li J. et al. // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2003. – Vol.284, N 6. – P. C1516-C1524.
132. Courville K.A., Lavie C.J., Milani R.V. Lipid-lowering therapy for elderly patients at risk for coronary events and stroke. // *Am. Heart Hosp. J.*, 2005 Fall;3(4):256-262.
133. Danysz W., Parsons C.G., Mobius H.-J. et al. Neuroprotective and synptomatological action of memantine relevant for Alzheimer's disease – A unified glutamatergic hypothesis on the mechanism of action // *Neurotox. Res.*, 2000.- Vol. 2.- P. 85-97.
134. Darius H. Role of nitrates for the therapy of coronary artery disease patients in the years be-yond 2000 // *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 1999.- 34 Suppl.- 2:S15–20; discussion S 29-31.
135. Dhakshinamoorthy S., Porter A. G. Nitric oxide-induced transcriptional tip-regulation of protective genes by Nrf2 via the antioxidant response element counteracts apoptosis of neuroblastoma cells.// *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 20096-2010
136. Dogan A., Eras M.A., Raghavendra Rao V.L., Dempsey R.J. Protective effects of memantine against ischemia-reperfusion injury in spontaneously hypertensive rats // *Acta Neurochir. (Wien)*, 1999.- Vol. 141.- P. 1107-1113.

137. Drexler H., Zeiher A.M., Meinzer K., Just H. Correction of endothelial dysfunction in coronary microcirculation of hypercholesterolaemic patients by L-arginine // *Lancet*. – 1991. - Vol. 338. – P. 1546-1550.
138. Dudek R., Wildhirt S., Confort A. et al. Inducible nitric oxide synthase activity in myocardium after myocardial infarction in rabbit // *Biochem. biophys. Res. Commun.* – 1994. - Vol. 205. – P. 1671-1680.
139. Dulak J., Jozkowicz A. Regulation of vascular endothelial growth factor synthesis by nitric oxide: facts and controversies. // *Antioxid. Redox. Signal*". 2003; 5: 123-132.
140. Eaton P., Jones M.E, McGregor M. et al. // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2003. – Vol. 14, N 3. – P. S290-S296.
141. Enhanced oxidative stress in iNOS-deficient mice after-traumatic brain injury: support for a neuroprotective role of-iNOS / H. Bayir, V. E. Kagan, G. G. Borisenko et al. // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 2005. – Vol. 25. – P. 673-684.
142. Erkinjuntti T., Inzitari D., Pantoni L. et al. Research criteria for subcortical vascular dementia in clinical trials // *J. Neurol. Transm.* 2000.- Suppl. 59.- P. 23-30.
143. Erkinjuntti T., Roman G., Gauthier S. Treatment of vascular dementia-evidence from clinical trials with cholinesterase inhibitors // *J. Neurol. Sci.* 2004.- Vol. 226. -P. 63-66.
144. Erben R.G., Soegiarto D.W., Weber K., Zeitz U., Lieberherr M., Gniadecki R., Moller G., Adamski J. and Balling R. // *Mol. Endocrinol.*,2002; 16, 1524-1537.
145. Feigin V.L., Rinkel G.J., Algra A. Et al.// *Cochrane Database Syst. Rev.*, 2000; (2):CD000277.
146. Frank P.G., Woodman S.E., Park D.S., Lisanti M.P. // *Arterioscler. Thromb. Vase. Biol.*, 2003.- Vol. 23, N 7.- P. 1161-1168.
147. Fujiwara N., Osanai T., Kamada T., Katoh T., Takahashi K., Okumura K. Study on the relationship between plasma nitrite and nitrate level and salt

- sensitivity in human hypertension: modulation of nitric oxide synthesis by salt intake // *Circulation*, 2000; 101(8):856-861.
148. Fukai T., Siegfried M. R., Ushio-Fukai M. et al. Regulation of the vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training. // *J. Clin. Invest.*, 2000; 105: 1631 — 1639.
 149. Galkina S.I., Ftomanova J.M., Stadnichuk V.I., et al. Nitric oxide-induced membrane tubulovesicular extensions (cytonemes) of human neutrophils catch and hold *Salmonella enterica* serovar Typhimurium at a distance from the cell surface. // *FEMS Immunol Med. Microbiol.*, 2009; 56:162-71
 150. Gaut J. P., Byun J., Tran H. D. et al. // *J. Clin. Invest.* – 2002. – Vol. 109, N 10.–P.1311-1319.
 151. Gerova M. Nitric oxide compromised hypertension: facts and enigmas. // *Physiol. Res.*, 2000; 49:27-35.
 152. Glemens M.G. Nitric Oxide in Liver Injury // *Hepatology*.-1999.-#1/-P.1-5.
 153. Grines C.L. The role of statins in reversing atherosclerosis: what the latest regression studies show. // *J. Interv. Cardiol.*, 2006; 19(1):3–9.
 154. Hall R., Chong C. A double-blind, parallel-group study of amlodipine versus long-acting nitrate in the management of elderly patients with stable angina // *Cardiology*, 2001; 96:72-77.
 155. Hampl V., Herget J. Role of nitric oxide in the pathogenic chronic pulmonary hypertension. // *Physiol. Rev.*, 2000: 1337-1372.
 156. Hanyu H., Tanaka Y., Asano T. et al. Parkinsonism in patients with subcortical arteriosclerotic encephalopathy: A magnetic resonance imaging study // *Geriatr. Gerontol. Internat.*, 2002.- Vol. 2.- P. 30-35.
 157. Huang K.P., Huang F.L. // *Biochem. Pharmacol.* – 2002. – Vol. 64, N 5-6. – P. 1049-1056.
 158. Ikeda U., Ito T., Shimada K. Statins and C-reactive protein. // *Lancet*, 1999; 353:1274-1275.

159. Kaplan N.M. The ASCOT trial: a closer look.// J Hypertens., 2006; 24(2):211–4.
160. Kataoka H., Otsuka F., Ogura T., Yamauchi T., Kishida M., Takahashi M., Mimura Y., Makino The role of nitric oxide and the rennin-angiotensin system in salt-restricted Dahl rats. Am. J. Hypertens., 2001; 14(3):276-85.
161. Kielstein J.T., Bode-Boger S.M., Haller H. et al. Functional changes in ageing kidney: is there a role for asymmetric dimethylarginine?// Nephrol Dial Transplant., 2003; 18:7:1245-1248.
162. Kolar F., Szarszoi O., Neckar J., Ostadal B. Improved cardiac ischemic tolerance in rats adapted to chronic hypoxia is reduced by stimulation treatment with N-acetylcysteine.// Eur. J. Heart Fail., 2003; 2(1, suppl.): 46.
163. Kolar F., Ostadal B. Molecular mechanisms of cardiac protection by adaptation to chronic hypoxia. //Physiol. Res. 2004; 53: S3-S13.
164. Kooy N.W., Royall J.A., Ye Y.Z. Evidence for in vivo peroxynitrite production in human acute lung injury // Amer. J. Respirat and Crit. Care Med. - 1995. - Vol. 151, N4. - P.1250-1254.
165. Langridge G.C., Naris S., Wain J. Nontyphoidal salmonella serovars cause different degrees of invasive disease globally//J.Infect.Dis.-2009.-Vol.199(4).-P.602-603.
166. Lata J., Zurankova J., Hugova E. et.al. Variccal bleeding in portal hypertension: bacterial infection and comparison of efficacy of intravenous and per oral application of antibiotics – a randomized trial//Eur/J/Gastroenterol.Hepatol.-2005.-Vol.17(10).-P.1105-1110.(162)
167. Lees K.R., Asplund K., Carolei A. et al. //J. Lancet. 2000 aug 12.- 355.
168. Leung Tung-Ming, Tipoe G.L., Liong E.C. et.al. Эндотелиальная синтаза оксида азота как важный фактор при экспериментальном фиброзе печени//Сучасна гастроентерология.-2010.-№51(55).-С.109-119.
169. Liaudet L, Soriano FG, Szabo C. Biology of nitric oxide signaling // Crit. Care Med. – 2000.- Vol. 28(Suppl).-N37.-P.52.

170. Linderoth G., Jepsen P., Schonheyder H.C. et al. Short-term prognosis of community-acquired bacteremia in patients with liver cirrhosis or alcoholism: A population-based cohort study//*Alcoholism Clin.Exp.Res.*-2006.-Vol.30 (4).-P.636-641.
171. Luckhoff A., Busse K. Refilling of endothelial calcium stores without bypassing the cytosol. *FEBS Lett.* 1990; 271: 108- 111.
172. Luscher T.F. Endothelial dysfunction as a therapeutic target. The ENCORE trials *European Heart J. Supplements*, 2000; 2 (Supplement D), D20-25.
173. Mannkhina E. B., Mashina S. Yu., Torshtin V. I. et al. Can adaptation to hypoxia help combating Alzheimer's disease? //*Hypoxia Med. J.* 2004; 12 (1-2): 2—14.
174. Mastroeni P. Immunity to systemic Salmonella infection // *Curr. Mol. Med.* – 2002. – Vol. 2, № 4. – P. 393–406.
175. Matsumori A., Yamada T., Suzuki H. et al. Increased circulating cytokines in patients with myocarditis and cardiomyopathy // *Brit. Heart J.* – 1994. - Vol. 72. – P. 561-566.
176. Meguro K., Ishii H., Yamaguchi S. et al. Is Vascular Cognitive Impairment the preclinical stage of Vascular Dementia: The Tajiri Project // 2nd Congress of the International Society for Vascular Behavioural and Cognitive Disorders (Vas-Cog). Abstract book. Florence, 2005. -P. 71.
177. Melino G., Catani M.V., Corazzari M. et al. // *Cell Mol. Life Sci.* – 2000. – N57. – P. 612-622.
178. McQuillan L. P., Leung G. K., Marsden P. A. et al. Hypoxia inhibits expression of eNOS via transcriptional and posttranscriptional mechanisms. //*Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 1999; 267: P1921-1927.
179. Molace V., Muscoli C., Masini E. et al. Modulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide and nitric oxide donors.// *Pharmacol. Rev.* 2005; 57: 217-252.
180. Muijsers R.B.R., Folkerts G., Henricks P.A.J. et al. Peroxynitrite: a two-faced metabolite of nitric oxide // *Life Sci.*, 1997;60:1833-1845.

181. Neckar J., Ostadal B., Kolar F. Myocardial infarct size-limiting effect of chronic hypoxia persists for five weeks of normoxic re-covery. //Physiol. Res., 2004; 53: 621—628.
182. Nitric oxide [http:// www.whatislife.com/reader2/Metabolism/pathway/Nohtml](http://www.whatislife.com/reader2/Metabolism/pathway/Nohtml).
183. Oemar B.S., Tschudi M.R., Godoy N. et al. Reduced endothelial nitric oxide synthase expression and production in human atherosclerosis.//Circulation, 1998;97(25): 2494-2498.
184. Olanow C.W. The scientific basis for the current treatment of Parkinson's disease // Annu. Rev. Med., 2004.- Vol.55. -P. 41-60.
185. Rinoo V., Shah M.D., Wesley Merritt M.D., Dwayne Collins R.N. and Gabor B. Racz M.D. Targeting the Spinal Nerve via A Double-Needle, Transforaminal Approach in Failed Back Surgery Syndrome: Demonstration of A Technique // Pain Physician. 2004; 7:93-97.
186. Rotkiewicz P., Sicinska W., Kolinski A. and DeLuca H.F. // Proteins, 2001,44, 188-199.
187. Sapirstein A., Bonventre J.V. //Neurochem Res., 2000, May; 25(5):745-53.
188. Semenza G. L. Deregulated gene expression: transcription! o trol of cardiorespiratory physiology by HIF-1. //J. Appl. Phys., 2004; 96: 1173-1177.
189. Shaul P. W., North A. J., Brannon T. S. et al. Prolonged in hypoxia enhances nitric oxide synthase type 1 and III gene pression in adult rat lung. //Am. .1. Respir. Cell. Mol. Biol. 19. 13: 167-174.
190. Shibata T., Nagata K., Kovayaghi Y. Apoptic neutrophils and nitric oxide regulate cytokine production by iFN γ -stimulated macrophages//Cytokine.- 2011.-Vol.53,N2.-P.191-195.
191. Schulz R., Schmidt D., Blum A. et al. Decreased plasma levcs; of nitric oxide derivatives in obstructive sleep apnoea: respons to CPAP therapy.// Thorax 2000; 55: 1046-1051.

192. Shctilz K., Mahnoudi S., Hatlar K. et al. Enhanced release superoxide from polymorphonuclear neutrophils in obstructiv sleep apnea: impact of CPAP therapy. *Am. J. Respir. Crit. Car Med.*, 2000; 162: 566-570.
193. Stuhlmeier K. M. Activation and regulation of Hsp32 and Hsp70. // *Eur. J. Biochem.* 2000; 267: 1161-1167.
194. Takizawa T., Tada T., Kitazawa K., Tanaka Y. et al.// *Neurol Res.*- 2001 Oct; 23(7):724-730.
195. Thiemerman C., Szabo C., Mitchel J.A., Vane J.R. Vascular hyporeactivity to vasoconstrictor agents and hemodynamic decompensation in hemorrhagic shock in mediated by nitric oxide.// *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 2008: 267-271.
196. Toda S., Stein R. S., Richards-Dinger K., Bozkurt S. Forecasting the evolution of seismicity in southern California: Animations built on earthquake ansfer // *J. Geophys. Res.* ,2005.-№110.- B05S16.
197. Tonkin A.M. Clinical relevance of statins: their role in secondary prevention. // *Atheroscler. Suppl.*, 2001 Feb; 2(1):21-25.
198. Toporsian M., Govindaraju K., Nagi M. et al. Downregulat:. of endothelial nitric oxide synthase in rat aorta after prolong' hypoxia in vivo. // *Circ. Res.* 2000; 86: 671—675.
199. Vallance P., Leone A., Calver A. et al. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure// *Lancet.* – 1992. – Vol. 339. – P. 572-575.
200. Vodovotz Y., Kim P.K.M., Bagci E.Z. et al // *Current Moï. Medicine.* – 2004. – Vol.4, N 7. – P. 753-762.
201. Wancata J., Krautgartner M., Friedrich F. The numbers of vascular dementia in Europe between the years 2000 and 2050 // 2nd Congress of the International Society for Vascular Behavioural and Cognitive Disorders (Vas-Cog). // *Abstract book. Florence, 2005.* -P. 36-37.

202. Wanchu A., Khullar M., Sud A., Bambery P. Elevated nitric oxide production in patients with primary Sjogren's syndrome // Clin. Rheumatol. – 2000. – Vol. 19, № 5. – P. 360-364.
203. Xu-Welliver M., Kanugula S., Pegg A.E. // Cancer Research. – 2002. – Vol.62, N 11. – P. 3037-3043.
204. Yang Y., Li Q., Ahmad F., Shuaib A. //Neurosci Lett 2000.-N 285(2).- p. 119-22.
205. Yuan G., Nanduri J., Bhasker C. R. et al. Ca²⁺/calmodulini nase-dependent activation of hypoxia inducible factor 1 tr. scriptional activity in cells subjected to intermittent hypoxia //Biol. Chem., 2005; 280: 4321-4328.
206. Zamora R., Vodovotz V., Billiar T.R. Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases // Molec. Med., 2000. -Vol. 6, №5.- P. 347-373.
207. Zehnder D., Bland R., Williams M.C., McNinch R.W., Howie A.J., Stewart P.M. and Hewison M. // J. Clin. Endocrinol. Metab.,2001; 86, 888-894.
208. Zhang W., Smith C., Monette R., Hutchison J., Stanimirovic D.B. //Acta Neurochir. Suppl., 2000; 76:47-53.
209. Zhou Z., Rahme E., Pilote L. Are statins created equal? Evidence from randomized trials of pravastatin, simvastatin, and atorvastatin for cardiovascular disease prevention. //Am. Heart J., 2006 Feb;151(2):273-281.
210. Zong P., Setty S., Sun W. et al. Intermittent hypoxic training protects canine myocardium from infarction. //Exp. Biol. Med., 2004; 229: 806-812.