

ЗНАЧЕНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ПУТЕЙ ГЕНЕРАЦИИ ОКСИДА АЗОТА В КРОВЕНОСНЫХ СОСУДАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ ПРИ СТАРЕНИИ

© Н. В. Кулева,¹ Д. А. Федоров, И. Е. Красовская

Кафедра биохимии С.-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург, 199034;

¹электронный адрес: nadezhda.kuleva@gmail.com

Старение является главным фактором риска для сердечно-сосудистых и нейродегенеративных заболеваний. Одной из причин этих заболеваний являются изменения в артериях, снабжающих кровью сердце и мозг. С возрастом нарушается функционирование эндотелиальных клеток внутреннего слоя сосудов, содержащего эндотелиальную синтазу оксида азота (eNOS), и она перестает синтезировать в достаточной степени NO, который регулирует тромбогенез и вазодилатацию в сосудах. Кроме eNOS синтез оксида азота в организме могут осуществлять различные нитритредуктазы при использовании эндогенных и экзогенных нитратов и нитритов. В обзоре рассмотрены изменения, происходящие в кровеносных сосудах при старении организма, и возможность использования пищевых нитратов и нитритов как дополнительного источника оксида азота и потенциала для предотвращения связанных со старением сердечно-сосудистых и нейродегенеративных заболеваний.

Ключевые слова: оксид азота, пищевые нитраты и нитриты, сердечно-сосудистые заболевания, старение, эндотелиальная NO-синтаза (eNOS).

Принятые сокращения: ВЭД — васкулярная эндотелиальная дисфункция, ЭЗР — эндотелий-зависимое расширение сосудов, ВН₄ — тетрагидробиоптерин, NO — оксид азота, NOS — NO-синтаза: eNOS, pNOS и iNOS — соответственно эндотелиальная, нейрональная и индуцибельная изоформы NOS.

Старение является неизбежным биологическим процессом. С возрастом увеличивается вероятность нарушений в работе организма, связанных со старением, таких как рак, артрит, деменция, остеопороз, диабет, нейродегенеративные и сердечно-сосудистые заболевания. Эти заболевания стареющего населения (после 60 лет), численность которого к 2050 г., вероятно, достигнет 2 млрд, во всем мире становятся основными социальными и экономическими проблемами (Tortegrossa et al., 2011). Успехи исследований связи старения с генетикой человека, особенно исследований геномных ассоциаций, заключаются в установлении значительного влияния генов на старение человека (т. е. обнаружения генетической предрасположенности).

Среди болезней, связанных со старением, значительная часть представлена сердечно-сосудистыми заболеваниями. При изучении роли генетической предрасположенности к заболеваниям, возникающим в процессе старения, были выявлены определенные гены, изменения которых могут быть причиной болезней, связанных со старением (Srivastava et al., 2015). К ним отнесен ген белка *NOS3*, который кодирует эндотелиальную синтазу оксида азота (eNOS), являющуюся главной изоформой фермента, образующего оксид азота (NO) в сердечно-сосудистой системе. *NOS3* является димерным ферментом, экспрессия и активность которого регулируются на транскрипционном, посттранскрипционном и посттрансляционном уровнях (Oliveira-Paula et al., 2016). Ген, который кодирует *NOS3*, имеет много полиморфных участ-

ков, содержащих либо замены одного нуклеотида, либо различное число tandemных повторов. В многочисленных исследованиях рассматривали влияние полиморфизмов этого гена на предрасположенность к заболеваниям и даже на продолжительность жизни (Федоров, 2013; Srivastava et al., 2015). Интересно, что некоторые структурные полиморфизмы гена *NOS3* приводят к функциональным изменениям экспрессии фермента eNOS или его активности, т. е. в конечном счете к изменению образования NO. По современным представлениям, поддержание гомеостаза NO в различных органах и тканях является необходимым для поддержания оптимального здоровья и предотвращения болезней (Tortegrossa et al., 2011). Интересно, что уменьшенная экспрессия фермента eNOS и его полиморфизм приводят к тромбозу мозговых сосудов и к инсультам и является наиболее вероятной причиной когнитивных нарушений и деменций, связанных с возрастом и ассоциированных с нейроваскулярной дисфункцией. До 2015 г. не было прямого доказательства связи дефицита eNOS с инсультом. Хорошей моделью ишемического инсульта оказалась мышь, гетерозиготная по eNOS(+/-) (Tang et al., 2015). У такой мыши уже в возрасте 3—6 мес было обнаружено тромбообразование в церебральных сосудах, приводившее к инсульту. Интересно, что окклюзия сосудов мозга у гетерозиготных по eNOS мышей (+/-) была обнаружена в тех же областях мозга, что и у пациентов с болезнью Альцгеймера. Кроме того, у этих мышей были обнаружены также церебральная амилоидная ангиопатия, разрушение гематоэнце-

фалического барьера и когнитивные нарушения. Таким образом, было получено прямое доказательство связи между частичной недостаточностью eNOS и нейроваскулярной дисфункцией.

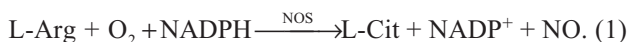
NO является одним из критических компонентов системы кровеносных сосудов организма и известен как регулятор ключевых сигнальных путей в здоровом организме. В макрососудах действие NO направлено на уменьшение воспаления и адгезии. NO тормозит тромбообразование и ускоряет течение крови. Его функция также связана с уменьшением сжатия (констрикции) сосудов и ремоделирования сосудистой стенки. В микрососудах, особенно капиллярах, NO наряду с определенными ростовыми факторами важен для ускорения образования новых сосудов (ангиогенеза). Исследования на животных и человеке подтвердили, что с возрастом, когда возникают сердечно-сосудистые заболевания, такая регуляция, опосредованная NO, нарушается на разных уровнях, и прежде всего уменьшаются образование NO, его период полужизни в тканях и его функциональный потенциал (Togregrossa et al., 2011).

В настоящем обзоре предпринята попытка обсудить современные данные литературы о механизмах функционирования NO как сигнальной молекулы в кровеносных сосудах млекопитающих при старении и возможности улучшения здоровья сосудов при старении за счет использования пищевых нитратов и нитритов.

Два пути синтеза NO в организме млекопитающих

У млекопитающих доминирующим способом образования NO является ферментативный синтез посредством одной из трех изоформ синтазы NO (нейрональной nNOS, индуцибельной iNOS и эндотелиальной eNOS, или NOS1, NOS2 и NOS3 соответственно). Различия между изоформами NOS основываются на варьировании участвующих в их регуляции факторов, в том числе их распределение в тканях организма, а также способов экспрессии и регуляции. Синтазы nNOS и eNOS экспрессируются конститутивно и обычно продуцируют небольшие количества NO (наномоли) в течение коротких периодов времени. Индуцибельная форма синтазы (iNOS) начинает синтезироваться и проявлять активность только после внешнего воздействия на клетки, в ответ на различные стимулы, в том числе цитокины и бактериальные эндотоксины. iNOS продуцирует большие количества NO (в 100—1000 раз больше, чем конститутивные изоформы фермента) и в течение продолжительного времени.

Ферменты NOS являются флавопротеинами, которые переносят электроны через NADPH, FAD, FMN и Fe²⁺ (в геме) (Daff, 2010). Для них необходим кофактор тетрагидробиоптерин (BH₄). Субстратами для NOS служат кислород (O₂) и аминокислота аргинин (Arg), а продуктами реакции являются NO и аминокислота L-цитруллин (L-Cit) согласно уравнению (1):



2 моля молекулярного кислорода и 1.5 моля NADPH используются для получения 1 моля образующегося NO (Daff, 2010).

Количество NO, которое синтезирует NOS, зависит от множества факторов, в том числе от наличия субстратов и кофакторов. На скорость синтеза влияют посттрансляционная модификация (фосфорилирование), а также доступность BH₄. Дефицит BH₄ может приводить к разобщению фермента и образованию супероксидного анион-радикала (O₂^{•-}) (Tejero, Staehr, 2013).

Концентрация аргинина как субстрата обычно не бывает лимитирующей, за исключением тех состояний организма, когда другие ферменты, например аргиназа, конкурируют с NOS за субстрат. В условиях, когда достаточно субстрата и кофакторов, наиболее значимой, определяющей скорость и количество синтезированного NO является локальная концентрация кислорода. K_M (константа Михаэлиса) для O₂ у каждой из изоформ NOS различается: для eNOS — 123, iNOS — 135 и nNOS — 350 нМ (Stuehr et al., 2004). При концентрациях кислорода ниже K_M для O₂ скорость образования NO для любой изоформы пропорциональна концентрации O₂ и линейно повышается, по мере того как эта концентрация растет.

Кроме ферментативного синтеза NO посредством NOS в организме имеются другие механизмы генерации NO (Кулева, Красовская, 2015). Пул NO, синтезированный eNOS, может частично превращаться церулоплазмином плазмы крови в пул нитрита, представляющий собой стабильный химический резервуар NO, который далее способен реагировать с оксигемоглобином (с образованием нитрата) или с дезоксигемоглобином с образованием NO (уравнение 2):



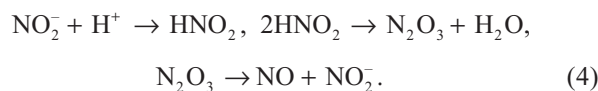
где HbFe²⁺ — дезоксигемоглобин, HbFe³⁺ — метгемоглобин.

В покое концентрация нитрата в плазме крови человека составляет 14—50, а концентрация нитрита 0.1—0.2 мкмоль/л, причем 70 % нитрита плазмы образуется из NO, синтезированного eNOS эндотелия кровеносных сосудов (Кулева, Красовская, 2015). Превращение нитрита в NO и другие сигнальные продукты, т. е. катализ нитрит-редуктазной активности, может осуществляться в различных компартментах клетки и связан с гемовыми структурами, железо- и серосодержащими кластерами и молибденсодержащими ферментами, например ксантин-оксидазой (KO, уравнение 3) (Kim-Shapiro, Gladwin, 2014):



В противоположность NOS-опосредованному синтезу NO, для которого необходим кислород как субстрат, катализ нитрат-редуктазных реакций усиливается при низкой концентрации O₂. Полагают, что он служит компенсаторным механизмом для синтеза NO в гипоксических условиях (Кулева, Красовская, 2015).

Нитраты пищи могут быть восстановлены до нитритов с участием редуктаз комменсальных бактерий в полости рта (Lundberg, Weitzberg, 2013). Эти нитриты со слюной попадают в желудок, где в среде с низким значением pH могут превращаться в NO согласно уравнению (4):



Лишь 25 % нитратов, поступивших с пищей, могут превращаться в NO в желудочно-кишечном тракте, однако возможность синтеза NO из пищевых или фармакологических нитратов может объяснять их физиологическое или терапевтическое действие при недостаточном синтезе NO синтазой eNOS эндотелия кровеносных сосудов, которое имеет место при старении.

Возрастное нарушение функции eNOS и его механизмы

Уменьшение биодоступности NO как результат его сниженной продукции посредством eNOS, увеличение его катаболизма являются ключевым механизмом, опосредующим васкулярную эндотелиальную дисфункцию (ВЭД) при старении (Taddei et al., 2001; Seal et al., 2011). Эндотелий кровеносных сосудов — это слой клеток внутри просвета сосуда, непосредственно контактирующий с кровью. Эти клетки производят много биологически активных веществ, которые действуют как аутокринные и (или) паракринные регуляторы функционирования кровеносных сосудов. ВЭД можно определить как любое нарушение в фенотипе нормального (здорового) эндотелия (Munzel et al., 2008), а определить ВЭД можно при измерении расширения сосуда, которое происходит при его стимулировании либо механическим, либо химическим способом (например, при помощи ацетилхолина), что должно вызывать увеличение продукции NO эндотелиальными клетками, приводящее к активации гуанилатциклазы, увеличению концентрации циклического ГМФ и релаксации гладких мышц сосуда (Ignarro et al., 1986). Чем больше величина зависящего от эндотелия расширения сосуда (ЭЗР), тем более выражена эндотелиальная функция.

При определении эндотелиального расширения на сонных артериях мыши было показано, что у старых животных эндотелиальная функция выражена в меньшей степени по сравнению с молодыми (Sindler et al., 2011). Как правило, для того чтобы определить активность эндотелия, связанную с функционированием NOS, применяют ее ингибитор L-NAME, и этот ингибитор значительно уменьшает ЭЗР у молодых животных, в то время как у старых животных — значительно меньше (Sindler et al., 2011).

Кроме NOS в регуляции ЭЗР сосудов могут участвовать и другие факторы, например гиперполяризующий фактор эндотелия (EDHF) и связанный с циклооксигеназой простаглицлин (Urakami-Narazwa et al., 1997). При старении отмечено нарушение EDHF-зависимой вазодилатации. У крыс его можно предотвратить с помощью антиоксидантов (Urakami-Narazwa et al., 1997), а причиной этого нарушения являются повышенная активность системы ренин—ангиотензин и уменьшенная экспрессия кальцийактивируемых калиевых каналов малой и промежуточной проводимости. При старении наблюдается и сдвиг баланса между факторами вазоконстрикции (тромбоксана A_2) и вазодилатации (простаглицлином) циклооксигеназного происхождения в сторону сокращающих факторов, поэтому возрастает зависящая от эндотелия вазоконстрикция. Известно, что активность циклооксигеназы сосудов может регулироваться NO и пероксинитритом, образующимся из NO и супероксиданионного радикала (Shi et al., 2006).

Как уже было отмечено, NO, синтезированный NOS, является ключевой молекулой в определении здоровья сердечно-сосудистой системы (Torregrossa et al., 2011). Нет никаких сомнений в том, что именно дефицит доступности NO в сосудах наблюдается при старении. Однако данные по влиянию старения на экспрессию eNOS полны противоречий: она может не меняться, уменьшаться и увеличиваться (Cernadas et al., 1998). Общепринято, что по мере старения активность eNOS уменьшается (Sau et al., 2012). Это может быть обусловлено дефицитом субстратов или кофакторов и посттрансляционными модификациями фермента. На посттрансляционном уровне может происходить фосфорилирование фермента по аминокислотному остатку Ser1177 посредством фосфатидилинозитолкиназы Akt, приводящее к повышению активности. Хотя уменьшение такого рода фосфорилирования у старых животных было показано, участие его в регуляции активности eNOS при старении человека еще требует подтверждения (Soucy et al., 2006). Как уже упоминалось, уменьшенная доступность NO при старении сосудов ведет к разобщению eNOS, что не только уменьшает продукцию NO, но и усугубляет процесс старения посредством образования супероксидного анион-радикала (Yang et al., 2009). Таким образом, уменьшение активности eNOS может объяснять уменьшение эндотелиальной вазодилатации при старении.

Хорошо известно, что существенными для старения являются два механизма: чрезмерный длительный окислительный стресс и увеличенная провоспалительная активность, которые действуют комплементарно, ставя под угрозу биодоступность оксида азота (Donato et al., 2007). Хотя многие ферменты могут генерировать активные формы кислорода (АФК), в качестве источников АФК в сердечно-сосудистой системе человека доминируют четыре ферментные системы: 1) NADPH-оксидаза, 2) ксантиноксидаза, 3) разобщенная NOS и 4) дыхательная цепь митохондрий (Brandess et al., 2005).

Общепринято, что митохондрии являются главным источником АФК, вызывающих процесс старения (Cai, Harrison, 2000; Lassegue, Griendling, 2010). Митохондрии действительно рассматриваются как доминирующий внутриклеточный сайт продукции $O_2^{\cdot -}$, который генерируется в результате утечки электронов из митохондриальной электрон-транспортной системы (Ungvari et al., 2010b).

Старение сосудов также ассоциируется с увеличением продукции АФК, определяемой гиперактивностью NADPH-оксидазы (Krause, 2007) и разобщением eNOS, что вместе со снижением активности Mn-супероксиддисмутазы приводит к накоплению H_2O_2 и $O_2^{\cdot -}$ и уменьшает доступность NO (Wenzel et al., 2008). При этом усиливается апоптоз клеток эндотелия и замедляются процессы регенерации и восстановления (Ungvari et al., 2010a). Наблюдается количественное увеличение факторов воспаления (Csiszar et al., 2008). Провоспалительный фенотип эндотелия характеризуется повышением уровня пероксинитрита (из NO, производимого iNOS) и продукцией сократительных факторов (Ignarro et al., 1986). Далее нарушенная способность к вазодилатации приводит к появлению структурных изменений сосудов, выражающихся в артериальной жесткости, которая наряду с воспалением и другими сердечно-сосудистыми факторами риска делает стареющего человека подверженным сердечно-сосудистым заболеваниям (Ungvari et al., 2004).

Сердечно-сосудистые заболевания, связанные со старением

Старение считается основным фактором риска для сердечно-сосудистых заболеваний. Защита сердца уменьшается с увеличением возраста, и это объясняется снижением концентрации NO. Уменьшение продукции NO может привести к гипертонии, атеросклерозу, заболеваниям периферических артерий, сердечной недостаточности и тромбозу, являющимся причинами сердечного приступа и смерти при старении.

Наряду со старением фактором риска для сердечно-сосудистой системы является гипертоническая болезнь, приводящая к функциональным и структурным изменениям в сердце и сосудистой системе (Taddei et al., 2001). Изменения в сосудах, связанные с гипертензией, такие как дисфункция эндотелия, являются первыми по времени изменениями, наблюдаемыми при старении. Заслуживает внимания наблюдение, свидетельствующее о том, что у пациентов после 60 лет доступность NO в сосудах печени полностью отсутствует. Эти результаты указывают на то, что эссенциальная гипертензия характеризуется зависящим от возраста снижением функции эндотелия. Основанная на NO терапия может снизить кровяное давление. Было показано, что введение через кожу нитроглицерина уменьшает артериальное давление у пациентов с недавно перенесенным инсультом (Willmot et al., 2006). Было показано также, что введение нитратов и нитритов с пищей снижает кровяное давление у человека (Larsen et al., 2006; Zand et al., 2011).

Атеросклероз является основным источником заболеваемости и смертности в развитых странах. Признаком атеросклероза также является снижение биодоступности NO. Концепция о дисфункции эндотелия кровеносных сосудов возникла на основе наблюдения изменений кровотока у больных атеросклерозом по сравнению со здоровыми. У здоровых людей активация eNOS

вызывает вазодилатацию растяжимых сосудов и артерий. В противоположность этому подобная стимуляция у пациентов с атеросклерозом дает ослабленную вазодилатацию периферических сосудов и вызывает парадоксальную вазоконстрикцию (сокращение) коронарных артерий, демонстрируя таким образом снижение продукции и (или) биологической доступности NO (Faxon et al., 2004).

Поврежденный эндотелий может уменьшать перфузию сосудов, продуцировать факторы, снижающие стабильность атеросклеротических бляшек, а также увеличивать реакцию тромбоцитов на разрыв бляшек (Lieberman et al., 1996). Есть целый ряд исследований, результаты которых показывают, что недостаточное образование NO в эндотелии связано со всеми основными факторами риска, такими как гиперлипидемия, сахарный диабет, гипертония и курение.

При гиперхолестеринемии окисленные липопротеины низкой плотности (oxLDL) стимулируют NADPH-оксидазу в стенке сосудов (Li, Forstermann, 2013), что приводит к повышению продукции супероксидного радикала ($O_2^{\bullet-}$) (см. рис. 1). $O_2^{\bullet-}$ реагирует с NO с образованием пероксинитритного радикала ($ONOO^{\bullet}$), который окисляет тетрагидроптерин (BH_4), необходимый для нормальной активности eNOS. При дефиците BH_4 разобшенная eNOS образует $O_2^{\bullet-}$. Кроме того, oxLDL уменьшают активность eNOS, ингибируя катализируемое инозитолкиназой фосфорилирование e-NOS по Ser1177, предотвращая взаимодействие eNOS с белком теплового тока Hsp90 и увеличивая образование кавеолина-1 (Cav-1), а также активируя эндотелиальную аргиназу 2 (Arg II) и таким образом, окисленные LDL конкурируют с eNOS за субстрат. Усиленный окислительный стресс и дефицит NO ускоряют атерогенез (Li, Forstermann, 2013).

Увеличение содержания NO или восстановление функции NOS становится способом ингибирования атеросклероза. Согласно последним данным (Li, Forster-

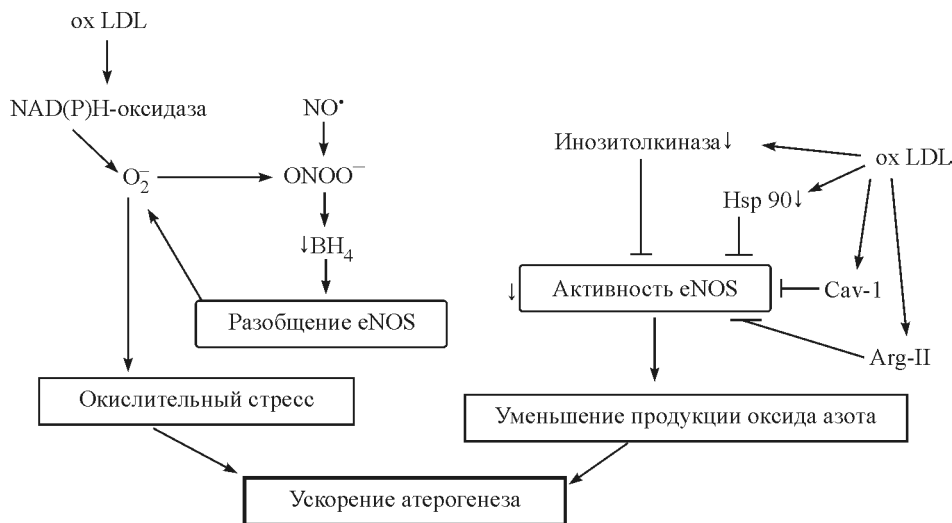


Рис. 1. Схематическое представление роли окислительного стресса и уменьшения продукции NO в развитии атеросклероза.

Окисленные липопротеины низкой плотности (oxLDL) стимулируют NADPH-оксидазу в стенке сосудов, что приводит к повышению продукции супероксиданионного радикала ($O_2^{\bullet-}$). $O_2^{\bullet-}$ реагирует с NO с образованием пероксинитритного радикала ($ONOO^{\bullet}$), который окисляет тетрагидроптерин (BH_4), необходимый для нормальной активности eNOS. При дефиците BH_4 разобшенная eNOS образует $O_2^{\bullet-}$. Кроме того, oxLDL уменьшают активность eNOS, ингибируя катализируемое инозитолкиназой фосфорилирование по Ser1177, предотвращая взаимодействие eNOS с белком теплового тока Hsp90 и увеличивая образование кавеолина-1 (Cav-1), а также активируя эндотелиальную аргиназу 2 (Arg II), и таким образом конкурируют с eNOS за субстрат. По: Li, Forstermann, 2013, с изменениями.

mann, 2013) фармакологические подходы, обращающие внимание на eNOS и усиливающие ее активность, улучшают биодоступность NO в кровеносных сосудах. В число лекарственных средств входят статины, β -адреноблокатор небиволол, органический нитрат пентаэритритл-тетранитрат и ряд других.

Показано (Stokes et al., 2009), что добавление нитрата с питьевой водой ингибирует миграцию и адгезию лейкоцитов в эндотелий сосудов, одно из первых проявлений атерогенеза, что подтверждает важность пути нитрат—нитрит—NO для предотвращения хронических заболеваний сосудов при старении.

Тромбоз приводит к смертельному исходу у 300 тыс. пациентов в США ежегодно (Torregrossa et al., 2011). NO ингибирует активацию тромбоцитов, их адгезию и агрегацию при воздействии на несколько сигнальных путей, в том числе активацию растворимой гуанилатциклазы и увеличение концентрации внутриклеточного цГМФ, ингибирование фосфатидилинозитол-3-киназы и ингибирование емкостного притока катионов и агонистзависимого увеличения внутриклеточного кальция (Треракова et al., 1999). Эти молекулярные изменения ведут к нарушениям активации тромбоцитов, адгезии, секреции, связыванию фибриногена с гликопротеином $\text{Ib} 11\text{a}$ и в конечном счете агрегации. Кроме того, NO ускоряет дезагрегацию тромбоцитов. Наряду с вазорелаксирующими функциями NO эти антитромбоцитарные эффекты поддерживают текучесть крови и перфузирование тканей.

Конститутивная NOS была обнаружена и в тромбоцитах, и в мегакариоцитах человека, и эта изоформа является активной (Zhou et al., 1995). Производимый ею NO не только слегка модулирует активацию тромбоцитов сильными и слабыми агонистами, но, что более важно, значительно ингибирует включение тромбоцитов в образование растущего тромба. NO, образованный эндотелиальными клетками и тромбоцитами, модулирует активацию тромбоцитов, адгезию и образование агрегатов, таким образом выступая как важный детергент для опосредованного тромбоцитами артериального тромбоза (Losealzo, 2001). Недостаточность NO из-за уменьшенной продукции либо окислительной инактивации ведет к проявлениям тромбоза. Усилия по восстановлению нормального окислительно-восстановительного баланса и (или) восстановления нормальной доступности NO могут представлять собой единственный терапевтический способ предотвращения зависящего от тромбоцитов артериального тромбоза у пациентов старшего возраста. Недавние исследования показали, что пищевые нитраты могут ингибировать агрегацию тромбоцитов (Webb et al., 2008), еще раз демонстрируя, что этот пищевой подход для пополнения недостающих количеств оксида азота в организме человека представляет собой первую линию обороны от недостаточности NO.

Если обратиться к механизмам активации нитрита, участвующих в модулировании тока крови, кровяного давления и гемостаза (тромбоза) (Kim-Shapiro, Gladwin 2014), то оказывается, что несколько ферментов способны продуцировать NO с достаточной скоростью, чтобы влиять на его биодоступность и сигнализацию в кровеносных сосудах. При благоприятных обстоятельствах продукция NO ксантиноксидазой, ангидридоксидазой, цитохром *c*-оксидазой, гемоглобином и миоглобином составляет 1—10 нМ/с. Современные исследования *in vitro* показывают, что монооксид азота, производимый эритро-

цитами крови при деоксигенировании из нитрита, участвует в торможении активации тромбоцитов у мыши и человека (Kim-Shapiro, Gladwin, 2014).

В разных тканях доминируют различные механизмы продукции NO из нитрита. Отсутствие влияния ингибитора ксантиноксидазы на опосредованное нитритом увеличение тока крови указывает на то, что ксантиноксидаза не является главным ферментом, участвующим в опосредованной нитритом вазодилатации, более важную роль выполняют гемоглобин крови и миоглобин гладких мышц. Напротив, в легких и печени в восстановлении нитрита до NO принимают участие ксантиноксидаза и альдегидоксидаза. В сердце главные редуктазы нитрита — это ксантиноксидаза, альдегидоксидаза и миоглобин. Изучение образования NO сульфидоксидазой, карбоангидразой и эндотелиальной NOS требует дальнейших исследований (Kim-Shapiro, Gladwin, 2014).

Наиболее тяжелой болезнью для стареющего населения является болезнь Альцгеймера (БА). Пациенты с БА теряют психические функции мозга, что приводит к нарушению восприятия, памяти и контактов с другими людьми. Только в США 5.4 млн человек живут с БА, причем ежегодно диагностируется 1 млн новых больных.

В последнее время становится более четкой и убедительной связь между БА и генерацией NO. Уменьшенные уровни NO и других оксидов азота были обнаружены у пациентов с различными формами БА (Corzo et al., 2007). Интересно, что факторы риска сердечно-сосудистых заболеваний (гипертония, гиперхолестеринемия, сахарный диабет, старение и малоподвижный образ жизни) ассоциируются с более высокой частотой БА. Общей чертой этих заболеваний является дисфункция эндотелия кровеносных сосудов, выражающаяся в снижении доступности NO (Dudzinski et al., 2006). Как было отмечено выше, БА является причиной когнитивных нарушений и деменции, ассоциированной с нейроваскулярной дисфункцией (Tang et al., 2015). Использование гетерозиготной по eNOS(+/-) мыши оказалось хорошей моделью, на которой было обнаружено тромбообразование в церебральных сосудах мыши уже в возрасте 3 мес. При этом окклюзии были обнаружены в тех же областях мозга, что и у пациентов с БА (Tang et al., 2015). У старых мышей с eNOS(+/-) была также обнаружена церебральная амилоидная ангиопатия (отложение амилоидных депозитов в мозговых сосудах, как правило, сопровождающее БА у человека). Таким образом, было получено доказательство связи БА с недостаточной функцией eNOS в мозговых сосудах.

В целом данные литературы показывают критическую роль для NO в развитии БА. По-видимому, нормальная и достаточная генерация (биодоступность) NO может модулировать и ингибировать экспрессию и образование β -амилоида ($A\beta$), но как только в мозге появляется $A\beta$, он начинает влиять на активность NO. Это создает непрерывную систему недостаточности NO и запускает механизм, который может ускорять прогрессирование БА. Сигнальные пути для NO (как через цГМФ, так и через S-нитрозилирование) могут быть важными терапевтическими мишенями для предотвращения и лечения небольших когнитивных нарушений, а также БА. Действительно, было показано, что высоконитратная диета увеличивает церебральный кровоток во фронтальной коре у старых пациентов (Presley et al., 2011).

Влияние добавления неорганического нитрита в пищу старых мышей на показатели здоровья кровеносных сосудов по отношению к показателям для молодых животных

Показатель	Величина показателя, %	
	старые животные	старые животные, получавшие нитрит
Показатели здоровья сосудов		
Степень дилатации сонной артерии	50	90
Жесткость стенки аорты	140	110
Показатели окислительного стресса		
Содержание нитротирозина аорты	200	50
Продукция супероксидного анион-радикала в гомогенате аорты мышей	200	40
Активность СОД в гомогенате аорты мышей	50	100
Экспрессия субъединицы р67 NADPH-оксидазы в аорте мышей	400	120
Факторы воспаления		
Интерлейкин 1 β	250	115
Интерлейкин 6	800	100
Интерферон γ	500	200
Фактор некроза опухолей α	200	100

Примечание. Данные взяты из работы Sindler et al., 2014 и пересчитаны в % по отношению к средним величинам для молодых животных. СОД — супероксиддисмутаза.

Значение различных механизмов синтеза NO для восполнения его недостаточности при старении кровеносных сосудов млекопитающих

В предыдущем разделе было показано, что добавление в пищу неорганических нитратов и нитритов зачастую уменьшает риск сердечно-сосудистых заболеваний. Для выяснения механизмов действия пищевых нитратов и нитритов проведено значительное число исследований на животных (Dejam et al., 2007). Ниже, в таблице, приводятся данные одного из таких исследований (Sindler et al., 2014). Приведенные данные показывают, что добавление неорганического нитрита в питьевую воду в концентрации 50 мг/л в течение 3 нед приводит к значительному улучшению показателей окислительного

стресса и воспаления у старых мышей, при этом значительно уменьшается жесткость сосудов и увеличивается степень расширения сосудов (ex vivo), зависящего от эндотелиального NO (см. таблицу). Эти данные демонстрируют возможность использования неорганического нитрата для улучшения состояния кровеносных сосудов при старении. Каким образом осуществляется этот и аналогичные эффекты, полученные на моделях сердечно-сосудистых заболеваний, не совсем ясно. Хотя точные механизмы до конца неясны, можно предложить следующее объяснение с участием нескольких механизмов. С одной стороны, нитрит может влиять на транскрипцию генов (Bryan et al., 2005; Soucy et al., 2006; Singh et al., 2012) и уменьшать количество радикала $O_2^{\bullet-}$, производимого NADPH-оксидазой и митохондриями, и в то же время поддерживать активность его главного скэвенжера антиокси-

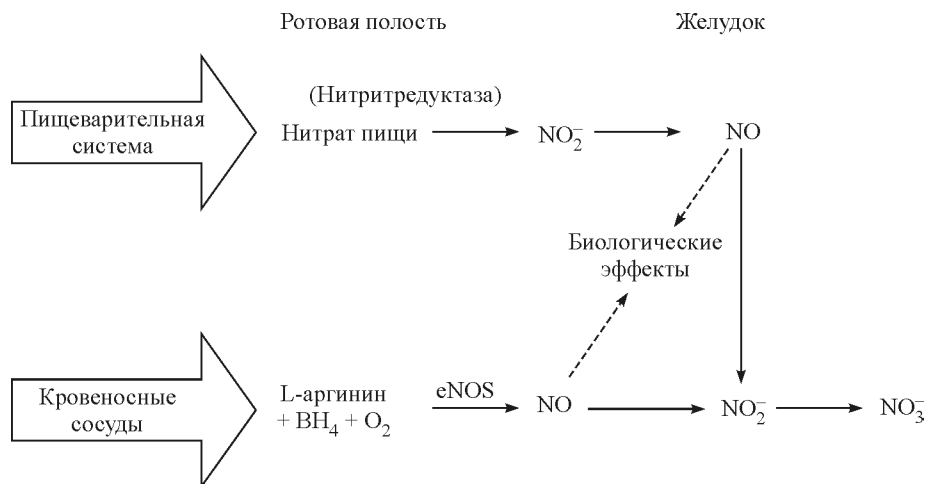


Рис. 2. Два пути генерации NO в организме млекопитающих. Схема.

дантного фермента Zn-содержащей супероксиддисмутазы. Эта нормализация васкулярного $O_2^{\cdot-}$ уменьшает изменения в структурных белках и их реакции с NO, уменьшает образование пероксинитритного радикала и восстанавливает активность ранее разобщенной eNOS, так что биодоступность NO повышается (см. таблицу) из-за ее меньшей деструкции при действии $O_2^{\cdot-}$ и большей продукции посредством eNOS. eNOS также образует меньше $O_2^{\cdot-}$ (при обращении порочного круга) (рис. 1) и подавляет воспаление. Кроме влияния на $O_2^{\cdot-}$ снабжение нитритом увеличивает доступность NO посредством последующего восстановления количества NO в крови и тканях, опосредованного двумя путями синтеза NO — энзиматическим и неэнзиматическим (рис. 2) (Lindberg et al., 2011). Таким образом, у старых животных восстанавливаются концентрации нитрата в крови и в артериях. Эти события приводят к улучшению и в ряде случаев к нормализации гомеостаза NO и функций сосудов. Следует подчеркнуть роль независимого от кислорода пути в восстановлении биодоступности NO при его недостаточности: нитрат—нитрит—NO (рис. 2). Этот путь связан с образованием NO в пищеварительной системе млекопитающих за счет первоначального восстановления нитратов пищи комменсальными бактериями или введения в ротовую полость фармакологического нитрита. Образовавшийся или введенный нитрит, попадая в кислую среду желудка, подвергается превращению в NO, который переходит в кровь, в кровь же переходит и нитрит, не превратившийся в NO. В крови, как уже было отмечено, нитрит под действием нитритредуктазной активности дезоксигенированного гемоглобина может также превращаться в NO, увеличивая концентрацию NO, генерируемого eNOS. А если при старении организма концентрация NO уменьшается и ее недостаточно для выполнения таких функций, как вазодилатация, регуляция адгезии лейкоцитов и агрегации тромбоцитов, то образующийся из нитрита NO начинает выполнять эти функции и улучшать состояние стареющих сосудов. Кроме того, роль нитритредуктазы в сосудах может выполнять дезоксимиоглобин гладких мышц сосудов. Известно, что у нокаутных по миоглобину мышей вазодилатация снижается примерно на 50 % (Totzeck et al., 2012).

Таким образом, при старении путь генерации NO из пищевых нитратов и нитритов начинает замещать синтез NO посредством eNOS в сосудах млекопитающих.

Нитраты и нитриты как добавки к пище начинают выполнять роль агентов заместительной терапии в отношении вазодилаторных, антиагрегатных и антиадгезивных функций NO. Возможность длительного использования их в сосудах в такой роли показана на животных, в том числе и на человекообразных обезьянах (Totzeck et al., 2012). Однако на человеке до сих пор продолжительность этих экспериментов была относительно кратковременной. Поэтому необходимы дальнейшие исследования, чтобы определить широкий терапевтический потенциал и влияние хронического введения нитратов и нитритов на физиологические и патофизиологические последствия в организме человека. Производимые в настоящее время клинические испытания, в которых проверяют эффективность добавления в пищу нитритов и нитратов, должны дать новые сведения о потенциальных множественных эффектах повышения биодоступности NO при физиологических нарушениях, связанных с возрастом. Несмотря на то что уже установлены клинические последствия кратковременного введения в пищу нитратов,

необходимы дополнительные исследования, чтобы установить эффективность хронического добавления в пищу нитратов и нитритов для стимулирования здоровья сосудов и предотвращения (лечения) сердечно-сосудистых заболеваний.

Список литературы

- Кулева Н. В., Красовская И. Е. 2015. Роль гемосодержащих глобинов в NO-сигнализации в клетках позвоночных при гипоксии. Цитология. 57 (8): 563—570. (Kuleva N. V., Krasovskaya I. E. 2015. The role of heme-containing globins in hypoxic NO-signaling of vertebrate cells. Tsitologiya. 57 (8): 563—570.)
- Федоров Д. А. 2013. NOS3 как «ген дожития» мужчин Северо-Запада России. Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. 12-3 : 81—83. (Fedorov D. A. 2013. NOS3 as «gene of survival» men of the Northwest of Russia. Actual Problems Sci. Humanitie. 12—3 : 81—83.)
- Brandess R. P., Fleming J., Busse R. 2005. Endothelial aging. Cardiovasc. Res. 66 : 286—294.
- Bryan N. S., Fernandez B. O., Bauer S. M., Garcia-Saura M. F., Mnislom A. B., Feelishch M. 2005. Nitrite is a signaling molecule and regulator of gene expression in mammalian tissues. Nat. Chem. Biol. 1 : 290—297.
- Cai H., Harrison D. C. 2000. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidative stress. Circ. Res. 87 : 840—844.
- Cau S. B., Carneiro F. S., Tostes R. C. 2012. Differential modulation of nitric oxide synthases in aging therapeutic opportunities. Front. Physiol. 3 : 218.
- Cernadas M. R., Sanchez de Miguel L., Garcia-Duran M., Gonzalez-Fernandez F., Millas J., Minton M., Rodrigo J., Rico L., Fernandez P. de Frutos F., Rodriguez-Feo J. A., Guerra J., Caramelo C., Casado S., Lopes F. 1998. Expression of constitutive and inducible nitric oxide synthases in the vascular wall of young and aging rats. Circ. Res. 83 : 279—286.
- Corzo L., Las R., Rodriguez S. 2007. Decreased levels of serum nitric oxide in different forms of dementia. Neurosci. Lett. 420 : 263—267.
- Csiszar A., Wang M., Lakatta E. C., Ungvari Z. 2008. Inflammation and endothelial dysfunction during aging: role of NF-kappa B. J. Appl. Physiol. 105 : 1333—1341.
- Daff S. 2010. NO synthase; structures and mechanisms. Nitric Oxide. 23 : 1—11.
- Dejam A., Hunter C. J., Tremontic C., Pleeta R. M., Hon Y. Y., Gladmwin M. T. 2007. Nitrite infusion in human and nonhuman primates: endocrine effects, pharmacokinetic, and tolerance formation. Circulation. 116 : 1821—1831.
- Donato A. J., Eskurra L., Silver A. E., Levy A. S., Pierce G. L., Gates P. E., Seal D. R. 2007. Direct evidence of endothelial oxidative stress with aging in human relation of impaired endothelium-dependent dilation and up regulation of nuclear factor kappaB. Circ. Res. 100 : 315—324.
- Dudzinski D. M., Igarashi J., Greif D. 2006. The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 46 : 235—276.
- Faxon D. P., Fuster V., Leibby P. 2004. Atherosclerotic vascular disease conference: writing group 111 : pathophysiology. Circulation. 109 : 2617—2625.
- Ignarro L. J., Harbison R. G., Wood K. S., Kadowitz P. J. 1986. Activation purified soluble guanylate cyclase by endothelium-derived relaxing factor from intrapulmonary artery and vein stimulation by acetylcholine, bradykinin and arachidonic acid. J. Pharmacol. Exp. Ther. 237 : 893—900.
- Kim-Shapiro D. B., Gladwin M. T. 2014. Mechanisms for nitrite bioactivation. Nitric Oxide. 38 : 58—68.
- Krause K. 2007. Aging: a revisited theory based on free radicals generated by NOS family NADPH oxidases. Exp. Gerontol. 42 : 256—262.

- Larsen F. J., Ekblom B., Sahlin K. 2006. Effect of dietary nitrate on blood pressure in healthy volunteers. *New Engl. J. Med.* 355 : 2792—2793.
- Lassegue B., Griendling K. K. 2010. NADPH oxidases: function and pathologies in the vasculature. *Arterioscler. Tromb. Vasc. Biol.* 30 : 653—661.
- Li H., Forstermann U. 2013. Uncoupling of endothelial NO-synthase in atherosclerosis and vascular diseases. *Curr. Opin. Pharmacol.* 13 : 1—7.
- Lieberman E. H., Gerhard M. D., Uehata A. 1996. Flow-induced vasodilatation of the human brachial artery is impaired in patients 40 years of age with coronary artery disease. *Amer. J. Cardiol.* 78 : 1210—1214.
- Lindberg J. O., Carlstrom M., Larsen F. F., Weitzberg E. 2011. Roles of dietary inorganic nitrate in cardiovascular health and disease. *Cardiovasc. Res.* 80 : 525—532.
- Losealzo J. 2001. Nitric oxide insufficiency, platelet activation and arterial thrombosis. *Circ. Res.* 88 : 756—759.
- Lundberg J. O., Weitzberg E. 2013. Biology of nitrogen oxides in the gastro-intestinal tract. *Gut.* 62 : 616—629.
- Munzel T., Sinning C., Post F., Warnholtz A., Schulz E. 2008. Pathophysiology, diagnosis and prognosis implication of endothelial dysfunction. *Ann. Med.* 40 : 180—196.
- Oliveira-Paula G. H., Lacchini R., Tanus-Santos J. E. 2016. Endothelial nitric oxide synthase: from biochemistry and gene structure to clinical implications of NOS3 polymorphisms. *Gene.* 573 : 584—599.
- Presley T. S., Morgan A. R., Bechtold E. 2011. Acute effect of a high nitrate diet on brain perfusion in older adults. *Nitric Oxide.* 24 : 34—42.
- Seal D. R., Jablonski R. L., Donato A. J. 2011. Aging and vascular endothelial function in human. *Clin. Sci. (London).* 120 : 357—375.
- Shi Y., Man E. Y., Vanhoutte P. M. 2006. Two isoforms of cyclooxygenase contribute in augmented endothelium-dependent contractions in femoral arteries of 1-year-old rats. *Acta Pharmacol. Sin.* 29 : 185—192.
- Sindler A. L., Fleenor B. S., Calvert J. W., Marshall K. D., Lefer D. F., Seal D. R. 2011. Nitrite supplementation reverses vascular endothelial dysfunction and large elastic artery stiffness with aging. *Aging Cell.* 10 : 429—437.
- Sindler A. L., De Van A. E., Fleenor B. S., Seal D. R. 2014. Inorganic nitrite supplementation for healthy arterial aging. *J. Appl. Physiol.* 116 : 463—477.
- Singh M., Arya A., Kumar R., Bhargawa K., Sethy N. K. 2012. Dietary nitrite attenuates oxidative stress and activates antioxidant genes in rat heart during hypobaric hypoxia. *Nitric Oxide.* 26 : 61—73.
- Soucy K. C., Ryoo S., Benjo A., Lim H. K., Gupta G., Sohi J. S., Elser J., Aon M. A., Nyhan D., Shoukas A. A., Berkowitz D. E. 2006. Impaired shear stress-induced nitric oxide production through decreased NOS phosphorylation contributes to age related vascular stiffness. *J. Appl. Physiol.* 101 : 1751—1759.
- Srivastava J., Thukrad N., Hasiya Y. 2015. Genetics of human age related disorders. *Adv. Gerontol.* 28 : 228—247.
- Stokes K. Y., Dugas T., Tang Y. 2009. Dietary nitrite prevents hypercholesterolemic microvascular inflammation and reverses endothelial dysfunction. *Amer. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 206 : H1281—H1285.
- Stuehr D. J., Santolmi J., Wang Z. Q., Wei C. C., Adak S. 2004. Update on mechanism and catalytic regulation in the NO-synthases. *J. Biol. Chem.* 278 : 36 167—36 170.
- Taddei S., Virdis A., Ghiadoni L., Salvetti G., Ysfunc G., Magagna A. N. 2001. Age-related reduction of NO availability and oxidative stress in human. *Hypertensions.* 38 : 274—279.
- Tang X., Xue Y., Ma T., Li J., Lan L., Malik K., McDonald M., Dopico A. M., Liap F. 2015. Partial eNOS deficiency causes spontaneous thrombotic cerebral infarction amyloid angiopathy and cognitive impairment. *Mol. Neurodegen.* 10 : 24—37.
- Tejero J., Staehr D. 2013. Tetrahydropterin in nitric oxide synthase. *JUBMB Life.* 65 : 358—365.
- Torregrassa A. C., Aranke M., Bryan N. S. 2011. Nitric oxide and geriatrics: implications in diagnostics and treatment of the elderly. *J. Geriatr. Cardiol.* 8 : 230—242.
- Totzeck M., Hedgen-Cotta U. B., Luedick P., Berenbrick M., Sheva S. F., Roessaf A. 2012. Nitrite regulates hypoxic vasodilatation via myoglobin-dependent nitric oxide generation. *Circulation.* 126 : 325—334.
- Trepakova E. S., Cohen R. A., Bolotina V. M. 1999. Nitric oxide inhibits capacitative cation influx in human platelets by promoting sarcoplasmic / endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase refilling of Ca²⁺-stores. *Circ. Res.* 84 : 201—209.
- Ungvari L., Bagi R., Feher A., Recchia F. A., Sonnetag W. E., Pearson K., de Cabo R., Csizsar A. 2010a. Resveratrol confers endothelial protection via activation of the antioxidant transcription factor Nrf 2. *Amer. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 299 : H18—H24.
- Ungvari L., Sonntag W. E., Gaiszar A. 2010b. Mitochondria and aging in the vascular system. *J. Mol. Med. (Berlin).* 88 : 1021—1027.
- Ungvari Z., Csizsar A., Kaley C. 2004. Vascular inflammation in aging. *Herz.* 29 : 733—740.
- Urakami-Harazwa L., Shimokawa H., Nakashima M., Egashira K., Takeshita A. 1997. Importance of endothelium-derived hyperpolarizing factor in human arteries. *J. Clin. Invest.* 100 : 2793—2799.
- Webb A. J., Patel N., Loukogeorgakissi M. 2008. Acute blood pressure lowering, vasoprotective and antiplatelet properties of dietary nitrate via bioconversion to nitrite. *Hypertension.* 51 : 784—790.
- Wenzel P., Schuhmacher S., Kienhofer J., Muller J., Hortmann M., Oetze M., Schulz E., Treiber N. 2008. Manganese superoxide dismutase and aldehyde dehydrogenase deficiency increase mitochondrial oxidative stress and aggravate age-dependent vascular dysfunction. *Cardiovasc. Res.* 80 : 280—289.
- Willmot M., Ghadmi A., Whysall B. 2006. Transdermal glyceryl trinitrate lowers blood pressure and maintains cerebral blood flow in recent stroke. *Hypertension.* 47 : 1209—1215.
- Yang Y. M., Huang A. M., Kaley G., Sun D. 2009. eNOS uncoupling and endothelial dysfunction in aged vessels. *Amer. J. Physiol. Heart Res. Circ. Physiol.* 297 : H1829—1836.
- Zand J., Lanza F., Gargtek 2011. All-natural nitrite and nitrate containing dietary supplement promotes nitric oxide production and reduced triglycerides in humans. *Nutr. Res.* 31 : 262—269.
- Zhou Q., Yellermann G. R., Solomonson L. P. 1995. Nitric oxide release from resting human platelets. *Thromb. Res.* 77 : 87—96.

THE ROLE OF DIFFERENT WAYS OF NITRITE OXIDE GENERATION
IN MAMMALIAN BLOOD VESSELS IN AGING

N. V. Kuleva,¹ D. A. Fedorov, I. E. Krasovskaya

St. Petersburg State University, Department of Biochemistry, St. Petersburg, 199034;

¹ e-mail: nadezhda.kuleva@gmail.com

Aging is the main risk factor for cardiovascular and neurodegenerative diseases. The reason of risk consists in disturbing of function of endothelial cells of inner layer of heart and brain vessel containing endothelial nitric oxide synthase (eNOS). The enzymatic activity of eNOS decreases and NO concentration regulating vasodilation and thrombogenesis decreases, correspondingly. In organism besides eNOS there are different nitrite reductases which catalyze NO synthesis using endogenic and exogenic nitrates and nitrites. In this review we discuss the changes in blood vessels occurring in aging and possible routes to use nitrates and nitrites of food as additional resource of nitric oxide in vessels and potential to prevent associated with aging cardiovascular and neurodegenerative diseases.

Key words: aging, food nitrates and nitrites, cardio-vascular diseases, nitric oxide (NO), nitrogen endothelial NO-synthase (eNOS).

—————