

УДК 616.15-008.1

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ СПОСОБНОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ
ГЕНЕРИРОВАТЬ ОКСИД АЗОТА У БОЛЬНЫХ
С СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ ПАТОЛОГИЕЙ****Шварц Я.Ш., Кручинина М.В., Тимофеева М.М., Рудина М.И., Долганова О.М.,
Громов А.А., Баум В.А., Рабко А.В.***ФГБНУ «Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины»,
Новосибирск, e-mail: kruchmargo@yandex.ru*

Описан способ определения NO-генерирующей функции эритроцитов, позволяющий оценить их вклад в развитие заболеваний, связанных с состояниями гипоксии, тромбоза, нарушения регуляции сосудистого тонуса и обмена оксида азота. Представлены данные пилотных исследований, демонстрирующие возможности клинично-лабораторного использования данного способа при заболеваниях сердечно-сосудистой системы.

Ключевые слова: гипоксия, эритроциты, оксид азота, хроническая сердечная недостаточность**DETERMINING THE ABILITY OF ERYTHROCYTE TO GENERATE
NITRIC OXIDE IN PATIENTS WITH CARDIOVASCULAR DISEASES****Shvarts Y.S., Kruchinina M.V., Timofeeva M.M., Rudina M.I., Dolganova O.M.,
Gromov A.A., Baum V.A., Rabko A.V.***Federal State Budgetary of Scientific Institution «Institution of Internal and Preventive Medicine»,
Novosibirsk, e-mail: kruchmargo@yandex.ru*

We presented a technique of determination of NO production by RBC, enabling to assess a contribution of these cells in pathogenesis of the disorders related to hypoxia, thrombosis, dysregulations of vascular tone and nitric oxide metabolism. The pilot study carried out demonstrated the possibilities of clinical-laboratory application of this technique in patients with cardio-vascular diseases.

Keywords: hypoxia, erythrocytes, nitric oxide, chronic heart failure

Оксид азота (NO) – газообразный, растворимый в воде свободно радикальный внутри- и внеклеточный вторичный мессенджер, обладающий паракринными регуляторными свойствами. В 1998 году в решении Нобелевского комитета по присуждению Нобелевской Премии по Физиологии и Медицине за открытие роли NO было указано, что «NO работает как сигнальная молекула в нервной системе, как оружие в борьбе с инфекциями, как регулятор артериального давления и как фактор, препятствующий кровопотере». Сегодня стало понятно, что биологические функции NO еще более многообразны и участвуют в регуляции работы практически всех органов, тканей и клеток организма. Формируя комплексы с тиолами, белками, полисахаридами, ионами металлов, гемопотеинами, NO образует циркулирующие в кровообращении комплексные соединения, обратимо депонирующие эту молекулу в связанном виде. Многие из этих комплексов и окисленные формы NO в большом количестве переносятся эритроцитами крови. В условиях гипоксии оксид азота высвобождается из молекул-депо, в результате его уровень в кровотоке компенсаторно повышается,

обеспечивая вазодилатацию и усиление кровоснабжения. Однако, каков реальный вклад эритроцитов в гипоксическую вазодилатацию в условиях конкретной патологии in vivo, неизвестно, поскольку способов исследования этой функции эритроцитов ранее не существовало.

В настоящей работе представлен впервые разработанный способ оценки NO-генерирующей функции эритроцитов человека и показана возможность его использования в условиях клиники. Предложенный подход может быть использован для оценки вклада данной функции эритроцитов в патогенез заболеваний, связанных с состояниями гипоксии, тромбоза, нарушения регуляции сосудистого тонуса и обмена оксида азота. Полученная информация может быть использована для оценки тяжести, прогноза и эффективности лечения этих заболеваний, а также для поиска новых фармакологических средств коррекции эритроцитарной дисфункции в экспериментальной фармакологии.

Оксид азота несет множество функций в поддержании сосудистого гомеостаза, включая контроль сосудистого тонуса, ингибирование тромбообразования, торможение

агрегации эритроцитов, регуляцию экспрессии молекул эндотелиальной адгезии. Свободно-радикальная природа оксида азота, его минимальная способность к диффузии, короткое время жизни и быстрая реакция с гемоглобином позволяют этой молекуле быть местным сигнальным агентом для активации растворимой гуанилатциклазы, что приводит к синтезу цГМФ и к цГМФ-зависимой вазодилатации [9, 10]. В последние годы появились доказательства того, что кроме локального воздействия короткоживущего оксида азота существуют дистантные эффекты этой молекулы, в том числе, вазодилатация, вызванная гипоксией. Дистантные эффекты NO связаны с существованием его циркулирующего резервуара в виде нитрозилированных соединений и молекул нитрита (NO_2^-) – продукта одноэлектронного окисления NO, присутствующего в эритроцитах (290 нМ) и в плазме (120 нМ) [2]. В тканях с изменением pH и градиента кислорода NO_2^- восстанавливается разнообразными ферментами и модулирует экспрессию белков, обмен веществ, ангиогенез, цитопротекцию и пр. В кровотоке под влиянием гипоксии нитритредуктаза, взаимодействуя с NO_2^- , образует NO, вызывая вазодилатацию [14]. В этой реакции нитритредуктазной активностью обладает железосодержащий деоксигенированный гемоглобин [$\text{deoxyHb(Fe}^{2+})$], формирующий в присутствии протона оксид азота и метгемоглобин. Далее $\text{deoxyHb(Fe}^{2+})$ под действием оксида азота может нитрозилироваться. Нитрит, содержащийся в эритроцитах, может служить источником оксида азота не только за счет нитритредуктазной активности $\text{deoxyHb(Fe}^{2+})$, но также за счет восстановления эритроцитарной ксантиноксидоредуктазой, либо спонтанного или усиленного карбонгидразой диспропорционирования [1, 15, 16]. Кроме того, эритроцитарными источниками NO в условиях гипоксии могут быть гем-нитрозил-гемоглобин [8] и S-нитрозогемоглобин [4, 7, 12]. Небольших концентраций оксида азота ($\text{EC}_{50} = 5\text{--}10$ нМ), покидающих эритроциты, достаточно для индукции вазодилатации. Важно, что при гипоксии способность эндотелиальной NO-синтазы генерировать оксид азота весьма лимитирована [3], и в этих условиях основным источником оксида азота становятся эритроциты.

Гипоксическая вазодилатация – фундаментальный компенсаторно-приспособительный ответ, повышающий перфузию ткани при недостатке кислорода. Наряду с повышением доставки кислорода за счет вазодилатации, генерируемый в эритроцитах NO ингибирует митохондриальное дыхание, тем самым уменьшая потребление

кислорода [13]. Эти механизмы, а также значение оксида азота в подавлении тромбообразования и агрегации эритроцитов позволяют утверждать, что в условиях ишемии эритроцитарная продукция NO представляет собой ключевой механизм поддержания сосудистого гомеостаза.

Несмотря на столь серьезную роль депонирования и генерации оксида азота в эритроцитах, количественных методов оценки этой функции эритроцитов не существует. В настоящее время используются лишь методы исследования *in vivo*, оценивающие реакцию сосудистой стенки или содержание в крови метаболитов и дериватов оксида азота.

Цель данной работы – представить способ определения функции эритроцитов генерировать оксид азота и продемонстрировать данные пилотных исследований по применению данного метода у пациентов с сердечно-сосудистой патологией.

Материалы и методы исследования

Выявление гипо-, нормо- или гиперпродукции NO эритроцитами в условиях гипоксии направлено на оценку их вклада в поддержание сосудистого гомеостаза. Принцип метода заключается в том, что одну часть образца стабилизированной крови помещают в условия гипоксии, получают плазму крови и определяют в ней содержание оксида азота, и одновременно содержание оксида азота определяют в плазме другой, не подвергавшейся гипоксии, части образца крови, вычисляют разницу полученных величин, сравнивают с аналогичным значением, полученным в контрольной группе, и по результату сравнения судят о состоянии функции эритроцитов генерировать оксид азота.

В ходе разработки технологии варьировали условия определения, выясняя возможность использования разных антикоагулянтов, способов получения гипоксии *in vitro*, замораживания образцов плазмы перед определением метаболитов NO, использования теста с физической, пищевой, или фармакологической нагрузкой. Число обследуемых в каждой группе было ≥ 6 .

В качестве антикоагулянта использовали цитрат натрия, ЭДТА или гепарин.

Условия гипоксии создавали:

а) помещением образца крови в атмосферу с малым содержанием кислорода, созданную такими приемами, как открытое пламя в замкнутом пространстве или откачивание воздуха или химическое поглощение кислорода или подача инертного газа или газовой смеси газ-генерирующим пакетом или мультигазовым инкубатором;

б) введением поглотителей кислорода, таких как сульфиты или оксидаза, непосредственно в образец крови.

Плазму крови перед определением в ней содержания оксида азота использовали сразу после получения или после хранения в замороженном виде.

Результаты измерения выражали в виде концентрации нитритов, приходящихся на эритроцитарную фракцию гематокрита или в виде концентрации ни-

тристов, приходящейся на количество эритроцитов в единице объема крови, в частности, на число эритроцитов в 1 л крови.

Непосредственное определение способности эритроцитов генерировать NO осуществляли следующим образом.

Образцы крови получали натошак из локтевой вены, используя стандартные разовые стерильные вакуумные пробирки с антикоагулянтом. Образец крови обследуемого в объеме 4 мл переносили в два 24-луночного планшета, заполняя в каждом планшете по 2 лунки по 1 мл на лунку. Далее один планшет с кровью помещали на 30 минут в условия искусственно созданной гипоксии, а второй оставляли в условиях атмосферного воздуха. Затем из образцов получали плазму крови и с использованием реактива Грисса [11] по суммарному количеству стабильных метаболитов оксида азота (нитриты и нитраты) определяли количество NO, выделенное эритроцитами. Для определения нитратов восстанавливали их в нитриты, используя металлический кадмий, покрытый медью [11].

Для определения метаболитов оксида азота полученную плазму крови отбирали в 8 пробирок по 150 мкл в каждой, депротеинизировали путем добавления 7,5 мкл 2М $ZnSO_4$, встряхивали на шейкере 2 мин, центрифугировали 10 мин при 12000 g и отбирали супернатант по 100 мкл в чистые пробирки. Пока происходила депротеинизация гранулы кадмия покрывали медью, для чего их трижды промывали деионизированной водой, помещали в 5 мМ раствор $CuSO_4$ на 5 мин, помешивая стеклянной палочкой, затем дважды промывали глицин-NaOH-буфером (pH 9,7), подсушивали и сразу использовали. Для определения нитритов использовали четыре пробирки. В остальные четыре пробирки добавляли по 33 мкл 0,2М глицин-NaOH буфера и 2 гранулы ($d \sim 2$ мм) кадмия, покрытого медью, встряхивали 15 мин, затем содержимое (жидкую часть) переносили в чистую пробирку и центрифугировали 7 мин при 12000 g. Супернатант использовали для определения нитритов. С этой целью в лунки 96-луночного планшета вносили в дублях по 50 мкл супернатантов, смешивали их с равным объемом реактива Грисса (смесь равных объемов 1% сульфаниламида в 30%-ной уксусной кислоте и 0,1% N-[1-нафтил]-этилендиамин дигидрохлорида в 60%-ной уксусной кислоте) и через 10 мин на планшетном спектрофотометре при длине волны 540 нм относительно лунок, в которые вместо реактива Грисса добавлена вода, измеряли оптическую плотность образцов. Содержание нитритов рассчитывали по калибровочному графику, построенному с использованием в качестве стандарта $NaNO_2$. Результаты выражали в мкмольях нитритов на 1 л плазмы.

При использовании данного способа определения функции эритроцитов генерировать оксид азота при употреблении обследуемым перед исследованием в пищу или в виде медпрепаратов большого количества нитратов возможны ложноположительные результаты. Для их предотвращения за 2 суток до проведения диагностической процедуры исключалось употребление нитрат-содержащих продуктов и соответствующих лекарств.

Чтобы иметь возможность судить о нормо-, гипо- или гиперфункции эритроцитов в отношении генерации оксида азота нами были определены нормальные значения данной функции в группе условно здоровых лиц (средний возраст составил 53 ± 6 года, поровну мужчин и женщин).

В пилотном исследовании образцы крови получали у пациентов с хронической сердечной недостаточностью, развившейся на фоне ишемической болезни сердца. Условия определения у больных были такими же, как в исследовании группы условно здоровых лиц. В качестве антикоагулянта использовали цитрат натрия.

Всего обследовано 10 мужчин и 8 женщин в возрасте 52 ± 8 лет (женщины – возраст постменопаузы) с ХСН II–IV функционального класса по классификации сердечной недостаточности Нью-Йоркской кардиологической ассоциации (NYHA). Диагноз был верифицирован на основании клинического, биохимического и инструментальных исследований, включая коронарографию и эхокардиографию, и устанавливался в соответствии с Рекомендациями Европейского общества кардиологов (ESC) и Национальными рекомендациями ОССН, РКО и РНМОТ по диагностике и лечению ХСН (четвертый пересмотр). Критериями включения в исследование явились: клинические признаки ХСН II А – III стадии, II–IV ФК в течение 3 месяцев и более; ишемическая этиология ХСН. Критериями исключения были клапанная патология сердца, почечная недостаточность, тяжелые диффузные заболевания печени, декомпенсированные эндокринопатии, психические, инфекционные или онкологические заболевания. При оценке степени тяжести ХСН у 5 (27,8%) больных выявлен II ФК, 9 (50%) – III ФК и у 4 (22,2%) IV ФК ХСН. В 2-ух случаях у пациентов верифицирован острый крупноочаговый инфаркт миокарда, у 4 (22,2%) больных диагностирован постинфарктный кардиосклероз, у 2 (11,1%) – стабильная стенокардия напряжения, у 2 (11,1%) – спонтанная стенокардия. Признаки атеросклероза периферических артерий выявлялись у 66,6% пациентов, дислипидемия у 77,8%, цереброваскулярные расстройства у 44,4%, сопутствующий сахарный диабет II типа – у 16,7% больных.

Исследование выполнено с одобрения Комитета Биомедицинской Этики ФГБНУ «НИИТБИМ» (протокол от 28.02.2015).

Статистическая обработка данных выполнена с использованием программы SPSS, ver. 17. Определялся характер распределения количественных признаков методом Колмогорова-Смирнова. В случае нормального распределения вычислялось среднее значение (M) и стандартная ошибка среднего (m). Достоверность различия показателей оценивали по критериям Стьюдента. Во всех процедурах статистического анализа критический уровень значимости нулевой гипотезы (p) принимался равным 0,05.

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты исследования с конкретными условиями определения NO-генерирующей функции эритроцитов в группе условно здоровых лиц представлены таблице.

Результаты исследования (таблица) свидетельствуют, что все использованные в исследовании условия позволяют адекватно судить об NO-генерирующей функции эритроцитов при сравнении с соответствующим контролем. Кроме того, представленные в таблице результаты свидетельствуют, что данный способ имеет высокий уровень воспроизводимости.

Значения NO-генерирующей функции эритроцитов у условно здоровых лиц при разных условиях определения ($M \pm m$)

№ примера	Условия определения		Без (до) гипоксии	После гипоксии	Разница между до и после*	Высвобождение из эритроцитов	
		Антикоагулянт				на гематокрит**	на 10^{12} эритроцитов
1	планшет с кровью помещали в плотно закрывающийся эксикатор с горящей свечой	Цитрат Na	$5,2 \pm 0,8$	$10,3 \pm 1,3^{\#}$	5,1/2,0	12,75	1,21
		ЭДТА	$4,8 \pm 0,5$	$10,4 \pm 1,1^{\#}$	5,6/2,20	14,0	1,33
		Гепарин	$5,4 \pm 0,4$	$11,4 \pm 1,1^{\#}$	6,0/2,1	14,2	1,43
2	планшет с кровью помещали в мультигазовый инкубатор Sanyo MCO-5M с газовой смесью, состоящей из 92% N_2 , 5% CO_2 и 3% O_2	Цитрат Na	$6,0 \pm 1,1$	$11,3 \pm 0,9^{\#}$	5,3/1,88	12,75	1,26
		ЭДТА	$6,1 \pm 0,8$	$12,0 \pm 1,2^{\#}$	5,9/1,97	14,75	1,40
3	планшет с кровью помещали в герметичный контейнер, содержащий дитионит натрия ($Na_2S_2O_4$).	Цитрат Na	$6,6 \pm 1,5$	$12,0 \pm 1,3^{\#}$	5,4/1,82	13,5	1,29
		ЭДТА	$6,7 \pm 0,8$	$11,8 \pm 1,2^{\#}$	5,1/1,76	12,75	1,21
4	планшет с кровью помещали в анаэробат с газ-генерирующим пакетом (состав газовой смеси 83-85% N_2 , 8-10% CO_2 , и 5% O_2)	Цитрат Na	$5,8 \pm 1,5$	$11,0 \pm 1,2^{\#}$	6,2/1,90	15,5	1,48
		ЭДТА	$6,1 \pm 0,6$	$11,7 \pm 1,3^{\#}$	5,6/1,92	14,0	1,33
5	Хранение плазмы до определения содержания метаболитов NO в течение 1 мес. при $-20^{\circ}C$. Гипоксия получена как в п. 1	Цитрат Na	$5,5 \pm 0,4$	$10,0 \pm 1,1^{\#}$	4,5/1,80	10,2	1,06
		ЭДТА	$5,1 \pm 0,4$	$10,5 \pm 0,6^{\#}$	5,4/2,10	12,3	1,28
6	Перед забором крови интенсивная физическая нагрузка на велоэргометре в течение 15 мин. Гипоксия получена как в п. 1	Цитрат Na	$3,5 \pm 1,4$	$4,7 \pm 0,9$	1,2/1,34	3,0	0,28
		ЭДТА	$3,7 \pm 1,3$	$4,8 \pm 1,7$	1,1/1,30	2,75	0,26
7	Постпрандиальная гиперлипидемия. Гипоксия получена как в п. 1	Цитрат Na	$3,4 \pm 0,3$	$5,3 \pm 0,4^{\S}$	1,9/1,56	4,41	0,45
		ЭДТА	$3,2 \pm 0,3$	$5,0 \pm 0,4^{\S}$	1,8/1,56	4,5	0,42
8	Перед забором крови обследуемый получил нитроглицерин. Гипоксия получена как в п. 1	Цитрат Na	$6,5 \pm 0,7$	$13,8 \pm 1,1^{\#}$	7,3/2,1	16,6	1,73
		ЭДТА	$6,2 \pm 0,5$	$14,0 \pm 0,5^{\#}$	7,8/2,3	18,57	1,86

Примечания. * – первая цифра – абсолютное значение (мкмоль/л) / вторая – кратность изменения; ** – расчёт производится по формуле: содержание NO (мкмоль/л)/значение гематокрита (в долях от единицы); $\S$ – различия между соответствующими группами до и после гипоксии значимы при $p \leq 0,05$; $\#$ – то же при $p \leq 0,001$.

Исследование способности эритроцитов генерировать NO у больных с хронической сердечной (ХСН) недостаточностью показало, что эта функция у части больных значительно усилена, тогда как у другой части, наоборот, резко снижена, а значения находящиеся в пределах нормы почти не встречаются. Анализ показал, что повышенная генерация NO гипоксическими эритроцитами наблюдается у больных, имеющих множественную хроническую коморбидную патологию с компенсированными формами ишемических расстройств. Уровни гипоксия-индуцированной продукции оксида азота колебались у таких паци-

ентов в пределах 7,8–9,4, составляя в среднем $7,5 \pm 1,6$ мкМ $NO_2/n \times 10^{12}$ эритроцитов. Низкие значения – в пределах 0,68–1,62 (среднее = $1,15 \pm 0,74$ мкМ $NO_2/n \times 10^{12}$ эритроцитов) – обнаруживались у наиболее тяжелых больных, находящихся в стадии обострения и/или имеющих признаки острой ишемии. У таких больных наблюдались, например, острый тромбоз левого желудочка в сочетании с ишемической кардиомиопатией, острый крупноочаговый инфаркт миокарда, ухудшение течения ИБС с тяжелыми приступами спонтанной стенокардии в сочетании с гипертонической болезнью III стадии и выраженным атеросклерозом

ряда магистральных артерий, декомпенсация ХСН в сочетании с ИБС и пароксизмом тахисистолической фибрилляции-трепетания предсердий и др.

В трех наблюдениях мы зарегистрировали относительно высокие значения генерации NO в пересчете на число эритроцитов при нарушениях со стороны эритронов, таких как гипохромная анемия и/или снижение численности эритроцитов и гематокрита. При этом без пересчета на эритроциты гипоксия-индуцированная продукция оксида азота была невелика. Полученные результаты позволяют говорить, что NO-генерирующая функция эритроцитов при ХСН варьирует в широких пределах, что, очевидно, связано со стадией/скоростью эритроцит-зависимой адаптации организма к условиям гипоксии и с возможностями включения эритрона в компенсаторно-приспособительный процесс [10]. При длительных ишемических состояниях механизмы генерации оксида азота в эритроцитах, по-видимому, успевают полностью включиться в процессы обеспечения сосудистого гомеостаза, и происходит гиперпродукция NO в эритроцитах, тогда как при острых сосудистых катастрофах наблюдается эритроцитарная дисфункция и обеспечиваемая красными кровяными клетками гипоксическая вазодилатация развивается в недостаточном объеме. Какие механизмы участвуют в ир-регуляции эритроцитарной генерации NO при хроническом ишемическом процессе – пока неизвестно. Известен АТФ-опосредованный механизм вазодилатации, при котором эритроциты выделяют АТФ, а тот, в свою очередь, активирует эндотелиальную NO-синтазу [2]. Вероятность серьезного вклада этого механизма в усиление перфузии ишемизированной ткани невелика, поскольку эндотелиальная NO-синтаза в условиях гипоксии не работает. Другой механизм – восстановление нитрита до NO деоксигемоглобином, включает трансмембранное поступление нитрита внутрь эритроцитов, выход NO из клетки или формирование промежуточных метаболитов типа N_2O_3 [4]. Многие считают этот механизм маловероятным, так как обычная концентрация NO_2 in vivo недостаточна для формирования физиологически значимых уровней NO, что обусловлено присутствием в плазме Hb и окси-Hb, быстро комплексуемых с NO, предотвращая его появление в свободном виде. Впрочем, неферментативное восстановление нитрита нуждается в кислой среде, а в зоне ишемии pH обычно ниже 6. В этой зоне возможно диспропорционирование NO_2 до NO спонтанным и карбангидраза-катализируемым путем.

Третий механизм увеличения эритроцитарной продукции NO может быть связан с активностью образованного при оксигенировании эритроцитов в легких гемоглобина, S-нитрозилированного оксидом азота на β -цепи по цистеину Cys93 [3]. В деоксигенированной крови S-нитрозилированный Hb (SNO-Hb) высвобождает NO на низкомолекулярные или связанные с белком тиолы, такие как глутатион или анионообменный белок-1 [12]. Весьма вероятно, гипоксия-зависимая повышенная генерация оксида азота обусловлена указанными механизмами, а ее снижение – их повреждением. Не исключено, что эритроцитарная гипо- или гиперпродукция NO регулируется и иными механизмами, например регуляцией активности ксантин-оксидоредуктазы или зависимым от воспаления балансом образования и распада комплекса FeNO-гемоглобин [15].

Заключение

Таким образом, нами предложен простой и надежный метод определения способности эритроцитов генерировать оксид азота при гипоксии. На примере хронической сердечной недостаточности продемонстрировано, что данный метод вполне применим в клинических условиях и может выявлять значительные изменения этой эритроцитарной функции. При этом у больных ХСН впервые удалось обнаружить явления эритроцитарной дисфункции, зависящие от характера течения процесса.

Список литературы

1. Aamand R., Dalsgaard T., Jensen F.B., Simonsen U., Roepstorff A., Fago A. Generation of nitric oxide from nitrite by carbonic anhydrase: a possible link between metabolic activity and vasodilation / R. Aamand, T. Dalsgaard, F.B. Jensen, U. Simonsen, A. Roepstorff, A. Fago // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2009. – Vol. 297, № 6. – P. 2068–2074.
2. Dejam A., Hunter C.J., Pelletier M.M., Hsu L.L., Machado R.F., Shiva S., Power G.G., Kelm M., Gladwin M.T., Schechter A.N. Erythrocytes are the major intravascular storage sites of nitrite in human blood / A. Dejam, C.J. Hunter, M.M. Pelletier, L.L. Hsu, R.F. Machado, S. Shiva, G.G. Power, M. Kelm, M.T. Gladwin, A.N. Schechter // *Blood*. – 2005. – Vol. 106, № 2. – P. 734–739.
3. Dweik R.A., Laskowski D., Abu-Soud H.M., Kaneko F., Hutte R., Stuehr D.J., Erzurum S.C. Nitric oxide synthesis in the lung. Regulation by oxygen through a kinetic mechanism / R.A. Dweik, D. Laskowski, H.M. Abu-Soud, F. Kaneko, R. Hutte, D.J. Stuehr, S.C. Erzurum // *J. Clin. Invest.* – 1998. – Vol. 101, № 3. – P. 660–666.
4. Gladwin M.T., Lancaster Jr. J.R., Freeman B.A., Schechter A.N. Nitric oxide's reactions with hemoglobin: a view through the SNO-storm / M.T. Gladwin, Jr. J.R. Lancaster, B.A. Freeman, A.N. Schechter // *Nat. Med.* – 2003. – Vol. 9, № 5. – P. 496–500.
5. Halpin S.T., Spence D.M. Direct plate-reader measurement of nitric oxide released from hypoxic erythrocytes flowing through a microfluidic device / S.T. Halpin, D.M. Spence // *Anal. Chem.* – 2010. – Vol. 82. – P. 7492–7497.
6. Herold S. The outer-sphere oxidation of nitrosyliron (II)hemoglobin by peroxynitrite leads to the release of nitrogen

- monoxide / S. Herold // *Inorg. Chem.* – 2004. – Vol. 43, № 13. – P. 3783–3785.
7. Jia L., Bonaventura C., Bonaventura J., Stamler J.S. S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control / L. Jia, C. Bonaventura, J. Bonaventura, J.S. Stamler // *Nature*. – 1996. – Vol. 380. – P. 221–226.
8. Liu K., Yan M., Zheng X., Yang Y. The dynamic detection of NO during the ischemic postconditioning against global cerebral ischemia/reperfusion injury / K. Liu, M. Yan, X. Zheng, Y. Yang // *Nitric Oxide*. – 2014. – Vol. 38. – P. 17–25.
9. Lundberg J.O., Weitzberg E., Gladwin M.T. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics / J.O. Lundberg, E. Weitzberg, M.T. Gladwin // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2008. – № 7. – P. 156–167.
10. Lundberg J.O., Gladwin M.T., Ahluwalia A., Benjamin N., Bryan N.S., Butler A., Cabrales P., Fago A., Feelisch M., Ford P.C., Freeman B.A., Frenneaux M., Friedman J., Kelm M., Kevil C.G., Kim-Shapiro D.B., Kozlov A.V., Lancaster J.R. Jr, Lefer D.J., McColl K., McCurry K., Patel R.P., Petersson J., Rassaf T., Reutov V.P., Richter-Addo G.B., Schechter A., Shiva S., Tsuchiya K., van Faassen E.E., Webb A.J., Zuckerbraun B.S., Zweier J.L., Weitzberg E. Nitrate and nitrite in biology, nutrition and therapeutics / J.O. Lundberg, M.T. Gladwin, A. Ahluwalia, N. Benjamin, N.S. Bryan, A. Butler, P. Cabrales, A. Fago, M. Feelisch, P.C. Ford, B.A. Freeman, M. Frenneaux, J. Friedman, M. Kelm, C.G. Kevil, D.B. Kim-Shapiro, A.V. Kozlov, J.R. Jr Lancaster, D.J. Lefer, K. McColl, K. McCurry, P.P. Patel, J. Petersson, T. Rassaf, V.P. Reutov, G.B. Richter-Addo, A. Schechter, S. Shiva, K. Tsuchiya, E.E. van Faassen, A.J. Webb, B.S. Zuckerbraun, J.L. Zweier, E. Weitzberg // *Nat. Chem. Biol.* – 2009. – Vol. 5, № 12. – P. 865–869.
11. Navarro-González J.A., García-Benayas C., Arenas J. Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids / J.A. Navarro-González, C. García-Benayas, J. Arenas // *Clin. Chem.* – 1998. – Vol. 44. – P. 679–681.
12. Rassaf T., Bryan N.S., Maloney R.E., Specian V., Kelm M., Kalyanaraman B., Rodriguez J., Feelisch M. NO adducts in mammalian red blood cells: too much or too little? / T. Rassaf, N.S. Bryan, R.E. Maloney, V. Specian, M. Kelm, B. Kalyanaraman, J. Rodriguez, M. Feelisch // *Nat. Med.* – 2003. – Vol. 9, № 5 – P. 481–482.
13. Shiva S., Rassaf T., Patel R.P., Gladwin M.T. The detection of the nitrite reductase and NO-generating properties of haemoglobin by mitochondrial inhibition / S. Shiva, T. Rassaf, R.P. Patel, M.T. Gladwin // *Cardiovascular Research*. – 2011. – Vol. 89, № 3. – P. 566–573.
14. van Faassen E.E., Bahrami S., Feelisch M., Hogg N., Kelm M., Kim-Shapiro D.B., Kozlov A.V., Li H., Lundberg J.O., Mason R., Nohl H., Rassaf T., Samouilov A., Slama-Schwok A., Shiva S., Vanin A.F., Weitzberg E., Zweier J., Gladwin M.T. Nitrite as regulator of hypoxic signaling in mammalian physiology / van E.E. Faassen, S. Bahrami, M. Feelisch, N. Hogg, M. Kelm, D.B. Kim-Shapiro, A.V. Kozlov, H. Li, J.O. Lundberg, R. Mason, H. Nohl, T. Rassaf, A. Samouilov, A. Slama-Schwok, S. Shiva, A.F. Vanin, E. Weitzberg, J. Zweier, M.T. Gladwin // *Med. Res. Rev.* – 2009. – Vol. 29, № 5. – P. 683–741.
15. Webb A., Milsom A., Rathod K., Chu W.L., Qureshi S., Lovell M.J., Lecomte F.M.J., Perrett D., Raimondo C., Khoshbin E., Ahmed Z., Uppal R., Benjamin N., Hobbs A.J., Ahluwalia A. Mechanisms underlying erythrocyte and endothelial nitrite reduction to nitric oxide in hypoxia: role for xanthine oxidoreductase and endothelial nitric oxide synthase / A. Webb, A. Milsom, K. Rathod, W.L. Chu, S. Qureshi, M.J. Lovell, F.M.J. Lecomte, D. Perrett, C. Raimondo, E. Khoshbin, Z. Ahmed, R. Uppal, N. Benjamin, A.J. Hobbs, A. Ahluwalia // *Circ. Res.* – 2008. – Vol. 103, № 9. – P. 957–964.
16. Zweier J.L., Wang P., Samouilov A., Kuppusamy P. Enzyme-independent formation of nitric oxide in biological tissues / J.L. Zweier, P. Wang, A. Samouilov, P. Kuppusamy // *Nat. Med.* – 1995. – Vol. 1, № 8. – P. 804–809.