

УДК 615:546.172.6:6116.42



МОДУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ РАЗЛИЧНЫХ СИНТАЗ ОКСИДА АЗОТА В КАЧЕСТВЕ ПОДХОДА К ТЕРАПИИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ

Д.В. Куркин, Е.Е. Абросимова, Д.А. Бакулин, Н.С. Ковалев, М.А. Дубровина,
А.В. Борисов, А.В. Стрыгин, Е.И. Морковин, И.Н. Тюренков

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Волгоградский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
400131, Россия, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, д. 1

E-mail: strannik986@mail.ru

Получена 16.11.2021

После рецензирования 10.02.2022

Принята к печати 11.03.2022

Оксид азота как терапевтический подход к лечению сердечно-сосудистых заболеваний привлек внимание исследователей еще в конце XIX века. Являясь вазодилататором, оксид азота может быть уникальным терапевтическим средством для лечения гипертензии и, как следствие, почечной недостаточности и гипертрофии левого желудочка.

Цель. Проанализировать данные литературы о возможных путях модуляции активности различных синтаз оксида азота в качестве подхода к терапии эндотелиальной дисфункции.

Материалы и методы. При поиске материала для написания обзорной статьи использовали такие реферативные базы данных, как PubMed, Google Scholar, e-Library, и др. Поиск осуществлялся по публикациям за период с 1990 по 2021 г. Параметрами для отбора литературы были выбраны следующие слова и словосочетания: оксид азота; NO-синтаза; эндотелиальная дисфункция; активатор NO-синтазы; ингибитор NO-синтазы.

Результаты. В статье представлена история открытия оксида азота и его биологическая роль, процесс его биосинтеза, а также изоформ ферментов его синтезирующих (NOS): нейрональной – nNOS, эндотелиальной – eNOS и индуцибельной iNOS и их роль в нормальной и патологической физиологии. Рассмотрен процесс разобщения NOS (его молекулярных механизмов) в качестве основы эндотелиальной дисфункции. Представлены примеры фармакологической коррекции (BH₄, ингибиторы аргиназы, статины, ресвератрол). Кроме того, описаны активаторы синтаз NO (кальция добезилат, cavNOxin, и некоторые активаторы транскрипции NOS), а также неселективные (L-NMMA, 1-NNA, L-NAME, ADMA, 546C88, VAS203) и селективные (L-NIO, 7-нитроиндазол, амингуанидин, L-NIL, GW273629, GW274150, кавтра-тин) ингибиторы синтаз оксида азота.

Заключение. Синтазы оксида азота продолжают оставаться перспективными мишенями для разработки средств, модулирующих их активность для коррекции различных патологий. В качестве терапевтического подхода модуляция активности синтазы оксида азота может быть реализована для лечения эндотелиальной дисфункции, являющейся причиной осложнений многих заболеваний.

Ключевые слова: оксид азота (II); NO-синтаза; эндотелиальная дисфункция; cavNOxin; ресвератрол; амингуанидин

Список сокращений: 7-NI – 7-нитроиндазол; AADP – 6-ацетил-7,7-диметил-5,6,7,8-тетрагидроптерин; ADMA – асимметричный диметиларгинин; AMPK – аденозинмонофосфат-активируемая протеинкиназа; AP-1 – activating protein-1 (активирующий белок-1); AP-2 – активирующий белок-2; ApoE – аполипопротеину E; BH₄ – дигидробиоптерин; BH₃ – тригидробиоптерин; BH₄ – тетрагидробиоптерин; CaD – кальция добезилат; cNOS – конститутивная изоформа NO синтазы; CO – монооксид углерода; DDAN – диметиларгинин диметиламиногидролаза; DHFR – дигидрофолатредуктаза; eNOS, NOS3 – эндотелиальная синтаза оксида азота; ER – рецепторы эстрогена; FGF – фактор роста фибробластов; FPP – фарнезилпирофосфат; GGPP – геранилгеранилпирофосфат; GSH – глутатион; GSSG – дисульфид глутатиона; GTPCH-I – гуанозин трифосфат циклогидролаза I; HUVEC – эндотелиальные клетки пупочной вены человека; IFN-γ – интерферон-γ; iNOS, NOS2 – индуцибельная синтаза оксида азота; L-NAME – N^G-нитро-L-аргинин; L-NIO – N(5)-(1-иминоэтил)-L-орнитин; L-NMMA – N^G-монометил-L-аргинин; L-NNA – N^G-нитро-L-аргинин; NF-1 – нейрофибромин 1; NF-kB – ядерный фактор-kB; nNOS, NOS1 – нейрональная синтаза оксида азота; NO – оксид азота (II); NOHA – N^G-гидроксид-L-аргинин; NOCCCL – NO-расщепляемый сшивающий агент; Nrf2, NFE2L2 – ядерный фактор-2, подобный фактору эритроидного происхождения 2; ODQ – 1H-[1,2,4]оксадиазоло-[4,3-a]хиноксалин-1-он; PCSK9 – пропротеин конвертаза субтилизин кексин 9; PI3K – фосфатидилинозитол-3-киназа; PKA – протеинкиназа A; PKC – протеинкиназа C; ROCK – Rho-ассоциированная протеинкиназа; ROS – активные формы кислорода; SREBP-2 – белок, связывающий регуляторный элемент стерола 2; TGF – трансформирующий фактор роста; TNFα – фактор некроза опухоли альфа; VEGF-A – фактор роста эндотелия сосудов A; АД – артериальное давление; АФК – активные формы кислорода; ГТФ – гуанозинтрифосфат; ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота; ЖКТ – желудочно-кишечный тракт; ЛПНП – липопротеины низкой плотности; ЛПС – липополисахарид; мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота; РА – ревматоидный артрит; рГЦ – растворимая гуанилатциклаза; ФАД – флавинадениндинуклеотид; ФМН – флавиномононуклеотид; цГМФ – гуанозинмонофосфат; ЦНС – центральная нервная система.

Для цитирования: Д.В. Куркин, Е.Е. Абросимова, Д.А. Бакулин, Н.С. Ковалев, М.А. Дубровина, А.В. Борисов, А.В. Стрыгин, Е.И. Морковин, И.Н. Тюренков. Модуляция активности различных синтаз оксида азота в качестве подхода к терапии эндотелиальной дисфункции. *Фармация и фармакология*. 2022;10(2):130-153. DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-2-130-153

© Д.В. Куркин, Е.Е. Абросимова, Д.А. Бакулин, Н.С. Ковалев, М.А. Дубровина, А.В. Борисов, А.В. Стрыгин, Е.И. Морковин, И.Н. Тюренков, 2022

For citation: D.V. Kurkin, E.E. Abrosimova, D.A. Bakulin, N.S. Kovalev, M.A. Dubrovina, A.V. Borisov, A.V. Strygin, E.I. Morkovin, I.N. Tyurenkov. Activity modulation of various nitric oxide syntases as an approach to endothelial dysfunction therapy. *Pharmacy & Pharmacology*. 2022;10(2): 130-153. DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-2-130-153

ACTIVITY MODULATION OF VARIOUS NITRIC OXIDE SYNTASES AS AN APPROACH TO ENDOTHELIAL DYSFUNCTION THERAPY

D.V. Kurkin, E.E. Abrosimova, D.A. Bakulin, N.S. Kovalev, M.A. Dubrovina,
A.V. Borisov, A.V. Strygin, E.I. Morkovin, I.N. Tyurenkov

Volgograd State Medical University,
1, Pavshikh Bortsov Sq., Volgograd, Russia, 400131

E-mail: strannik986@mail.ru

Received 16 Nov 2021

After peer review 10 Feb 2022

Accepted 11 March 2022

Nitric oxide as a therapeutic approach to the treatment of cardiovascular diseases attracted the attention of researchers at the end of the 19th century. As a vasodilator, nitric oxide may be a unique therapeutic agent for the treatment of hypertension and, as a result, renal failure and left ventricular hypertrophy.

The aim of the article is to analyze the literature data on possible ways of modulating the activity of various nitric oxide synthases as an approach to the treatment of endothelial dysfunction.

Materials and methods. When searching for materials for writing a review article, such abstract databases as PubMed, Google Scholar, e-Library, etc., were used. The search was carried out on the publications for the period from 1990 to 2021. The following words and phrases were chosen as parameters for the literature selection: nitric oxide; NO synthase; endothelial dysfunction; NO synthase activator; NO synthase inhibitor.

The following words and phrases were chosen as parameters for the literature selection:

Results. The article presents the history of the nitric oxide discovery and its biological role, the process of its biosynthesis, as well as the isoforms of its synthesizing enzymes (NOS): neuronal – nNOS, endothelial – eNOS and inducible iNOS, and their role in normal and pathological physiology. The process of NOS uncoupling (its molecular mechanisms) has been considered as the basis of endothelial dysfunction.

The examples of the pharmacological correction (BH₄, arginase inhibitors, statins, resveratrol) are presented. In addition, NO synthase activators (calcium dobesilate, cavNOxin, and some NOS transcription activators), as well as non-selective (L-NMMA, 1-NNA, L-NAME, ADMA, 546C88, VAS203) and selective (L-NIO, 7-nitroindazole, aminoguanidine, L-NIL, GW273629, GW274150, cavtratin) inhibitors of nitric oxide synthase have been described.

Conclusion. Nitric oxide synthases continue to be promising targets for the development of agents that modulate their activity to correct various pathologies. As a therapeutic approach, modulation of the nitric oxide synthase activity can be implemented to treat endothelial dysfunction, which is the cause for complications of many diseases.

Keywords: nitric oxide (II); NO synthase; endothelial dysfunction; cavNOxin; resveratrol; aminoguanidine

Abbreviations: 7-NI – 7-Nitroindazole; ADDP – 6-Acetyl-7,7-dimethyl-5,6,7,8-tetrahydropterin; ADMA – asymmetric dimethylarginine; AMPK – adenosine monophosphate-activated protein kinase; AP-1 – activating protein-1; AP-2 – activating protein-2; ApoE – apolipoprotein E; BH₂ – dihydrobiopterin; BH₃ – trihydrobiopterin; BH₄ – tetrahydrobiopterin; CaD – Calcium Dobesilate; cNOS – constitutive nitric oxide synthase; CO – carbon monoxide; DDAH – dimethylarginine dimethylaminohydrolase; DHFR – dihydrofolate reductase; eNOS, NOS3 – endothelial nitric oxide synthase; ER – estrogen receptor; FGF – fibroblast growth factor; FPP – farnesyl pyrophosphate; GGPP – geranylgeranyl diphosphate; GSH – glutathione; GSSG – glutathione disulfide; GTPCH-I – guanosine triphosphate cyclohydrolase I; HUVEC – human umbilical vein endothelial cells; IFN-γ – interferon gamma; iNOS, NOS2 – inducible nitric oxide synthase; L-NAME – N^G-nitro-L-arginine; L-NIO – N(5)-(1-Iminoethyl)-L-ornithine; L-NMMA – N^G-monomethyl-L-arginine; L-NNA – N^G-nitro-L-arginine; NF-1 – neurofibromin 1; NF-kB – nuclear factor-kB; nNOS, NOS1 – neuronal nitric oxide synthase; NO – nitric oxide (II); NOHA – N^G-hydroxy-L-arginine; NOCCL – NO-cleavable cross-linker; Nrf2, NFE2L2 – nuclear factor erythroid 2, (NF-E2)-related factor 2; ODQ – 1H-[1,2,4] oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one; PCSK9 – proprotein convertase subtilisin/kexin type 9; PI3K – phosphoinositide 3-kinase; PKA – protein kinase A; PKC – protein kinase C; ROCK – Rho-associated protein kinase; ROS – reactive oxygen species; SREBP-2 – Sterol regulatory element-binding protein 2; TGF – transforming growth factor; TNFα – Tumor necrosis factor alpha; VEGF-A – vascular endothelial growth factor A; ABP – arterial blood pressure; ROI – reactive oxygen intermediate; GTP – Guanosine-5'-triphosphate; DNA – deoxyribonucleic acid; GIT – gastrointestinal tract; LDL(s) – low-density lipoproteins; LPS – lipopolysaccharide; mRNA – messenger ribonucleic acid; RA – rheumatoid arthritis; sGC – soluble guanylate cyclase; FAD – flavine adenine dinucleotide; FMN – flavin mononucleotide; cGMP – cyclic guanosine monophosphate; CNS – central nervous system.

ВВЕДЕНИЕ

Для оксида азота (II) (NO) характерен широкий спектр свойств: от токсичного загрязнителя воздуха до провоспалительного медиатора и регулятора важнейших функций организма (вазомоторная, нейромедиаторная).

NO – бесцветный токсичный газ, был впервые изучен британским химиком Джозефом Пристли в 1772 году. Ученик Теофиль-Жюль Пелуза (разработал нитроцеллюлозу и другие нитросульфаты), итальян-

янский химик Асканио Соберо в 1847 году открыл нитроглицерин, для которого отметил способность воспроизводимо вызывать сильные головные боли. Другой ученик Пелуза, Альфред Нобель, объединил это очень нестабильное соединение с кизельгуром и запатентовал его в 1867 году как более стабильный коммерческий взрывной динамит.

У вовлеченных в производство нитроглицерина рабочих было отмечено исчезновение симптомов стенокардии. В 1879 году британский врач Уильям

Мюррелл предложил нитроглицерин для лечения стенокардии. В 1977 году Ферид Мурад обнаружил, что позитивное действие нитроглицерина на гладкие мышцы сосудов обусловлено высвобождением NO. Нобелевская премия по физиологии и медицине 1998 г. была присуждена совместно Фериду Мураду и Роберту Ф. Ферчготту, которые вместе с Джоном Завадски в 1980 г. установили важность эндотелий релаксирующего фактора, вызванной вазодилатирующим действием ацетилхолина.

В конце 1970-х годов Роберт Ферчготт начал исследовать вазоактивные эффекты ацетилхолина, что привело к открытию NO.

В начале 1980-х было проведено несколько исследований, в результате которых установили химические свойства и механизм действия эндотелий-зависимого фактора релаксации. Сходство между свойствами NO и свойствами эндотелий-зависимого фактора релаксации было определено к 1986 г.

В 1987 году две отдельные лаборатории – Р. Ферчготта и Дж. Завадски, а также Луи Дж. Игнарро совместно с Сальвадором Монкадой [1] – опубликовали окончательные доказательства того, что именно NO является эндотелий-зависимым фактором релаксации [2].

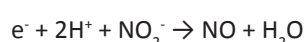
Открытие NO как эндогенно генерируемого сигнального агента, имеющего особое значение для сердечно-сосудистой системы, положило начало новой эре в изучении биологической передачи сигналов в конце 1980-х – начале 1990-х годов. Это открытие изменило имевшуюся на тот момент парадигму и продемонстрировало, что небольшая, свободно диффундирующая молекула может быть эндогенно синтезирована, чтобы действовать как специфический сигнальный фактор посредством взаимодействий с рецепторным белком [3].

Основные эффекты NO

NO играет важную роль в регуляции различных физиологических процессов, которые имеют решающее значение для функционирования многих тканей организма. Когда передача сигналов NO нарушена, эти центральные тканевые процессы могут стать патофизиологическими, вызывая острые или хронические заболевания в ЦНС [4–7], сосудах [8–10], ЖКТ [11, 12], скелетных мышцах [13, 14] и иммунной системе [15, 16].

Биосинтез NO и передача сигнала в NO-ергической системе

Эндогенный NO образуется ферментативными путями (в основном), но существует и неферментативный путь (рисунок 1А). Неферментативное производство NO включает продукцию NO из нитрита несколькими путями, особенно в условиях ацидоза (например, после ишемии), и происходит в основном в тканях преимущественно посредством восстановления нитрита:



В условиях ишемии с ацидозом опосредованная нитритом продукция NO приближается к максимальной конститутивной продукции синтазы оксида азота (NOS), что делает этот путь альтернативой при ишемии, т.е. в условиях, в которых продукция NO из NOS нарушена [17].

ЦЕЛЬ. Обобщить и проанализировать литературные данные о системе оксида азота, его биосинтезе и способах модуляции активности различных синтаз оксида азота в качестве подхода к терапии эндотелиальной дисфункции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

При поиске материала для написания обзорной статьи использовали такие реферативные базы данных, как PubMed, Google Scholar, e-Library, и др. Поиск осуществлялся по публикациям за период с 1990 по 2021 гг. Параметрами для отбора литературы были выбраны следующие слова и словосочетания: оксид азота; NO-синтаза; эндотелиальная дисфункция; активатор NO-синтазы; ингибитор NO-синтазы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

NO-синтазы и их роль

Ферментативное образование NO катализирует различными изоформами NOS посредством серии окислительно-восстановительных реакций в присутствии кислорода с расщеплением L-аргинина до L-цитруллина и NO через промежуточный метаболит N-гидрокси-1-аргинин (NOHA), используя НАДФН в качестве донора электронов.

Изолированная NOS была впервые выделена Бредом и Снайдером в 1990 [18]. Три основных фермента NOS млекопитающих уже были клонированы и успешно экспрессировались в *E. coli* или в клетках насекомых, их характеристика была установлена к 1998 г.

Три основные изоформы NOS были идентифицированы на основании их различных первичных аминокислотных последовательностей (идентичность только 50–60%), тканевого и клеточного распределения и способа регуляции. Две изоформы NOS кальций/кальмодулин-зависимые и конститутивно экспрессируются (cNOS, constitutive nitric oxide synthase): NOS эндотелиального происхождения (NOS3, eNOS, endothelial nitric oxide synthase) и NOS нейронального происхождения (NOS1, nNOS, neuronal nitric oxide synthase) соответственно. Третья изоформа NOS индуцируется цитокинами и её активность не зависит от кальция/кальмодулина (NOS2, iNOS, inducible nitric oxide synthase). Отдельные свойства каждой изоформы NOS имеют большое значение, поскольку именно величина, продолжительность и клеточные участки продукции NO определяют её общий физиологический или патофизиологический эффект [19].

В то время, как iNOS обычно продуцирует боль-

шое количество NO и участвует в иммунной защите, воспалительных реакциях и продукции NO эпителиальными клетками дыхательных путей, конститутивно экспрессируемые изоформы nNOS и eNOS, обычно, генерируют NO в наномолярных концентрациях, которые важны для физиологических процессов, таких как нейрональная передача сигналов, ингибирование системы гемостаза, вазодилатация и контроль артериального давления (АД). Также NO, синтезированный в таких количествах, не окисляется быстро и может напрямую взаимодействовать с ионами металлов в белках, например с атомом железа в гемовой группе гемоглобина, миоглобина, растворимой гуанилатциклазы (pGC), цитохрома P450 и самой NOS [20].

Все изоформы NOS используют тетрагидриобиптерин (BH_4 , tetrahydrobiopterin), синтезирующийся из гуанозинтрифосфата (ГТФ) ферментом ГТФ-циклогидролазой-I (GTPCH-I). Другими кофакторами являются флавинадениндинуклеотид (ФАД), флавиномононуклеотид (ФМН) и гем. Все белки NOS являются гомодимерами.

Функциональная NOS переносит электроны от НАДФН из карбоксиконцевого редуктазного домена через флавины ФАД и ФМН к гему в N-концевом оксигеназном домене. Домен оксигеназы также связывает важный кофактор BH_4 , молекулярный кислород и субстрат L-аргинин. На участке гема электроны используются для восстановления и активации O_2 , а также для окисления L-аргинина до L-цитруллина с последующим высвобождением NO.

Чтобы синтезировать NO, фермент NOS проходит через два этапа. На первом этапе NOS гидроксилирует L-аргинин до N^{ω} -гидрокси-L-аргинина, который остается в значительной степени связанным с ферментом. На второй стадии NOS окисляет N^{ω} -гидрокси-L-аргинин до L-цитруллина и NO.

Все изоформы NOS связывают кальмодулин. В nNOS и eNOS связывание кальмодулина вызывается увеличением концентрации внутриклеточного Ca^{2+} . Когда сродство кальмодулина к NOS увеличивается, это облегчает поток электронов от НАДФН в домене редуктазы к гему в домене оксигеназы. В индуцибельной NOS (iNOS) кальмодулин связывается уже при чрезвычайно низких внутриклеточных концентрациях Ca^{2+} из-за другой аминокислотной структуры сайта связывания кальмодулина (рисунок 1Б и В). Все белки NOS содержат кластер цинк-тиолат, образованный ионом цинка, который тетраэдрически координирован с двумя мотивами CysXXXXCys (по одному от каждого мономера) на границе димера NOS. Цинк в NOS выполняет структурную, а не каталитическую функцию [21].

Эндотелиальная NO-синтаза

Эндогенная продукция NO, особенно в сердечно-сосудистой системе, в основном зависит от актив-

ности фермента эндотелиальной NO-синтазы. Фермент eNOS был первоначально идентифицирован и выделен из эндотелиальных клеток аорты крупного рогатого скота [22, 23]. Дальнейшие исследования показали, что несколько типов неэндотелиальных клеток, такие как кардиомиоциты [24], тромбоциты [25] и нейроны [26], также экспрессируют eNOS.

Ген eNOS располагается в районе 7q35–7q36 хромосомы 7 у человека [27]. Этот ген присутствует в виде единственной копии в гаплоидном наборе генома человека.

Несмотря на то, что eNOS экспрессируется конститутивно, множество факторов регулируют eNOS на транскрипционном, посттранскрипционном и посттрансляционном уровнях. В связи с этим, вариации гена eNOS влияют на регуляцию фермента eNOS и, соответственно, на продукцию NO [28].

В физиологических условиях eNOS отвечает за продукцию большей части эндотелиального NO, и по этой причине он играет ключевую роль в регуляции сердечно-сосудистой системы. Этот факт постоянно подтверждается клиническими и экспериментальными исследованиями. В частности, у мышей с нокаутом гена eNOS быстро развивается гипертония и наблюдается высокий риск инсульта или других сердечно-сосудистых заболеваний по сравнению с мышами дикого типа. Подобные нарушения воспроизводятся также путем фармакологического ингибирования eNOS.

Механизмы регуляции активности eNOS чрезвычайно сложны и могут быть разделены на два уровня: генетический и белковый. На генетическом уровне экспрессия и стабильность генов eNOS связаны с её активностью. Промотор eNOS содержит большое количество сайтов для связывания факторов транскрипции, включая белок-активатор-1 (AP-1), белок-активатор-2 (AP-2), семейство эндотелина, ядерный фактор-kB (NF-kB, nuclear factor-kB), и нейрофибрин 1 (NF-1). Эти комплексы факторов транскрипции могут регулировать экспрессию eNOS, а гипоксия, липополисахарид и несколько цитокинов способны её индуцировать.

В эндотелиальных клетках, находящихся в состоянии покоя, большая часть экспрессированного eNOS прикрепляется к кавеолам, карманообразным инвагинациям мембраны, обогащенным холестерином и сфинголипидами. Локализация eNOS в кавеолах эндотелиальных клеток инактивирует фермент в результате сильного и прямого взаимодействия eNOS с кавеолином-1. Это белок-белковое взаимодействие ингибирует активность eNOS, главным образом, вмешиваясь в сайт связывания кальмодулина. Напротив, связывание активируемого кальцием кальмодулина с eNOS замещает кавеолин-1 и способствует активации eNOS. Кальмодулин взаимодействует с родственными сайтом связывания на eNOS, расположенным между доменами оксигеназы и редуктазы. Это

связывание сдвигает соседнюю аутоингибиторную петлю и позволяет НАДФН-зависимый ток электронов к гему фермента. Однако в отсутствие связанного кальмодулина перенос электронов блокируется, и каталитическая активность eNOS подавляется. Помимо кавеолина-1, eNOS может взаимодействовать с белком теплового шока 90 (Hsp90), белком, участвующим в многокомпонентной шаперонной системе, которая отвечает за сворачивание нескольких белков. Hsp90 участвует в сворачивании eNOS и может аллостерически модулировать фермент, вызывая конформационные изменения или путем стабилизации димерной формы, тем самым активируя eNOS. Необходимо отметить, что активность eNOS зависит от наличия субстрата (L-аргинин) и кофакторов (НАДФН и BH_4) [28, 29].

Помимо указанных механизмов, eNOS может также активироваться стимулами, которые не вызывают устойчивого увеличения внутриклеточного Ca^{2+} , но все же приводят к длительному высвобождению NO. Основным стимулом является напряжение сдвига. eNOS может быть фосфорилирована по нескольким остаткам серина (Ser), треонина (Thr) и тирозина (Tyr). Фосфорилирование Ser1177 стимулирует поток электронов в домене редуктазы, увеличивает чувствительность фермента к Ca^{2+} и представляет собой дополнительный и независимый механизм активации eNOS [21].

Нейрональная NO-синтаза

Этот тип NOS экспрессируется конститутивно. Ген nNOS, расположенный на хромосоме 12, имеет сложную геномную организацию. Предполагается, что клеточная и тканеспецифическая регуляция nNOS связана с различными факторами транскрипции, такими как активаторный белок-2 (AP-2), фактор-усилитель транскрипции-1 (TEF-1)/фактор связывания MCAF, белок, связывающий элемент ответа цАМФ (CREB)/активирующий фактор транскрипции/c-Fos, ядерный респираторный фактор-1, Ets, ядерный фактор-1 и NF-каппа В [30].

Кроме того, nNOS подвергается более чем десяти различным вариантам альтернативного сплайсинга, которые потенциально обладают уникальными структурными особенностями и каталитическими свойствами. В головном мозге форма nNOS α , содержащая экзон 2, является основным вариантом сплайсинга, тогда как nNOS μ является преобладающим вариантом сплайсинга в скелетных мышцах и сердце. nNOS-2, обнаруженный в мозге мышей, действует как доминантный негативный регулятор активности nNOS из-за делеции в рамке считывания 105 аминокислотных остатков 504-608, участвующих в связывании аргинина. И nNOS α , и nNOS μ прикреплены к субклеточным структурам через домен PDZ, тогда как другие две формы, nNOS β и nNOS γ , являются цитоплазматическими [31].

Посттрансляционные модификации представляют собой дополнительный уровень регуляции активности nNOS и включают в себя фосфорилирование, убиквитинирование и взаимодействия с другими структурными и регуляторными белками, в результате чего образуется функциональный комплекс.

Ферментативная активность nNOS модулируется фосфорилированием по множеству сайтов и способствует взаимодействию между NO и другими сигнальными путями через различные протеинкиназы. Фосфорилирование nNOS может происходить по множеству остатков, включая серин (Ser), треонин (Thr) и тирозин (Tyr), что связано с активацией/инактивацией фермента напрямую, либо с модуляцией других регуляторных доменов, присутствующих в nNOS.

Помимо фосфорилирования, убиквитинирование и сумоилирование – это два основных посттрансляционных регуляторных механизма, участвующих в контроле уровней и функций нескольких нейронных белков. Убиквитинирование белков является сигналом для деградации дисфункциональных белков.

В клетках головного мозга nNOS присутствует в виде связанной и растворимой форм. Дифференциальная субклеточная локализация nNOS объясняет разнообразие его функций [21, 32].

Механизмы регуляции nNOS схожи с таковыми для eNOS: кальций-связывающий белок, кальмодулин, действует как аллостерический активатор и так же, активность nNOS регулируется белками теплового шока. Белки теплового шока (HSP) включают семейство молекулярных шаперонов, ответственных за правильную укладку и созревание белков. Аппарат шаперона на основе Hsp90/Hsp70 регулирует активность и оборот nNOS посредством модуляции лиганд-связывающих щелей [32].

NOS нейронов содержит домен PDZ и может напрямую взаимодействовать с аналогичными доменами других белков. Эти взаимодействия определяют субклеточное распределение и активность фермента. Белки, содержащие PDZ-домен, такие как синтрофин, PSD-95 или PSD-93, играют важную роль в формировании мультибелковых сигнальных комплексов и необходимы для связывания nNOS с различными источниками кальция. В скелетных мышцах nNOS прикрепляется к сарколемме через белки синтрофина и дистрофина. Находясь в ЦНС, nNOS соединяется с цитоплазматическим хвостом NMDA-NR2 через PSD95, который отвечает за приток кальция с последующей активацией nNOS. Субклеточное фракционирование ткани мозга показывает, что примерно половина nNOS в головном мозге растворима, а остальная, через PSD95, связана с мембранной фракцией. Белки PSD преимущественно экспрессируются при более высоких синаптических плотностях и взаимодействуют с nNOS через домены PDZ [32, 33].

Нейрональная NOS участвует в модуляции физи-

ологических функций, таких как обучение, память и нейрогенез. В центральной нервной системе nNOS опосредует долгосрочную регуляцию синаптической передачи. Образующийся в ЦНС NO (под действием nNOS), участвует в центральной регуляции АД [7]. Помимо мозговой ткани, nNOS была обнаружена в спинном мозге, в симпатических ганглиях и надпочечниках, в периферических нервах, в эпителиальных клетках различных органов, в нефронах, в клетках островков поджелудочной железы и в гладкомышечных клетках сосудов.

Индукцируемая NO-синтаза

Ген iNOS располагается на 17-й хромосоме. Индуцибельная изоформа NOS в основном регулируется на уровне экспрессии. Механизмы, регулирующие экспрессию iNOS, включают модуляцию активности промотора, стабильности и трансляции мРНК, и, в итоге, белка. Как и в отношении других ферментов, активность iNOS зависит от доступности субстрата. Стимулы и условия, определяющие экспрессию iNOS, зависят от функционального состояния клетки и её вида. Индукторы экспрессии iNOS в одном типе клеток могут не иметь влияния или даже подавлять экспрессию iNOS в другом, даже в пределах одного организма [34].

Индукцируемая NOS не экспрессируется в клетках постоянно, но ее синтез может быть стимулирован бактериальным липополисахаридом, провоспалительными цитокинами (гамма-интерфероном, ИЛ-1, ИЛ-2, фактором некроза опухоли) или другими агентами, например, активными формами кислорода, а также гормонами, которые воздействуют на синтез циклического аденозинмонофосфата (адреналин, глюкагон). Хотя iNOS в первую очередь идентифицируется в макрофагах, экспрессия фермента может быть стимулирована практически в любой клетке или ткани, при условии, что были идентифицированы соответствующие индуцирующие агенты. После экспрессии iNOS постоянно активна и не регулируется внутриклеточными концентрациями Ca^{2+} [35].

Индукцируемая в макрофагах NOS производит большое количество NO, который представляет собой основу цитотоксичности этих клеток. Благодаря своему родству к железу, связанному с белками, NO способен ингибировать ключевые ферменты, каталитические центры которых его содержат. К ним относятся железо-серные кластер-зависимые ферменты (комплексы I и II), участвующие в митохондриальном электронном транспорте, рибонуклеотидредуктаза (фермент, ограничивающий скорость репликации ДНК) и цисконитаза (ключевой фермент в цикле лимонной кислоты). Более высокие концентрации NO, продуцируемые индуцированными макрофагами, могут напрямую повреждать ДНК клеток-мишеней и вызывать разрывы и фрагментацию цепей. Сочетание этих эффектов, вероятно, лежит в основе цитостатического и цитотоксического действия NO на

паразитические микроорганизмы и некоторые опухолевые клетки. Интересно, что неиммунные клетки также могут быть индуцированы цитокинами для высвобождения количества NO, достаточного для воздействия на соседние клетки. Например, было показано, что активированные цитокинами эндотелиальные клетки лизируют опухолевые, а индуцированные гепатоциты могут использовать NO для уничтожения спорозоитов малярии. Активность iNOS, вероятно, ответственна за все эти эффекты [21].

В отличие от eNOS и nNOS, iNOS имеет гораздо более высокое сродство к кальмодулину, поэтому он может его связывать при очень низких концентрациях Ca^{2+} и, таким образом, его активность не регулируется Ca^{2+} /кальмодулином, а в основном на уровне транскрипции. Кинетические параметры iNOS определяют уровень каталитической активности, которая генерирует более высокое, чем eNOS и nNOS, количество NO, и менее чувствительна к NO-зависимому аутоингибированию, что способствует взаимодействию больших количеств NO с активными формами кислорода (АФК) и генерации более токсичных форм азота, таких как нитрат [36].

Активность экспрессированного iNOS регулируется различными факторами, включая доступность его субстрата и кофакторов, взаимодействие с другими белками и аутоинактивацию (в меньшей степени).

Некоторые белки взаимодействуют с iNOS и регулируют его активность. В центральной нервной системе (мозге) мышей, которым вводили липополисахарид (ЛПС), iNOS обнаруживается в комплексе с цитозольным белком, называемым калирином (в основном калирином-7). Калирин взаимодействует с мономерами iNOS, но не с её димерами. В клетках, экспрессирующих калирин, большая часть iNOS существует в виде гетеродимера с калирином. Мономерного iNOS мало, что указывает на то, что калирин ингибирует активность iNOS, предотвращая её гомодимеризацию. Низкая экспрессия калирина коррелирует с повышенной активностью iNOS в гиппокампе пациентов с болезнью Альцгеймера. Поскольку избыток NO, образующийся во время воспаления, является нейротоксичным, калирин, подавляя iNOS, может оказывать нейропротекторное действие. В макрофагах iNOS взаимодействует с белком массой 110 кДа, который называется ассоциированным с NOS белком 110 (NAP110). Комплексы NAP110 и iNOS обнаруживаются в селезенке и перитонеальных макрофагах мышей, которым вводили интерферон- γ (IFN- γ) и ЛПС. Совместная экспрессия NAP110 и iNOS снижает активность последнего на 90%, хотя количество белка iNOS не меняется. Подобно калирину, NAP110 ингибирует активность iNOS, взаимодействуя с мономерами iNOS и предотвращая димеризацию фермента. Следовательно, NAP110 может быть блокирующим регулятором, предотвращающим повышение уровня NO от токсичности [37].

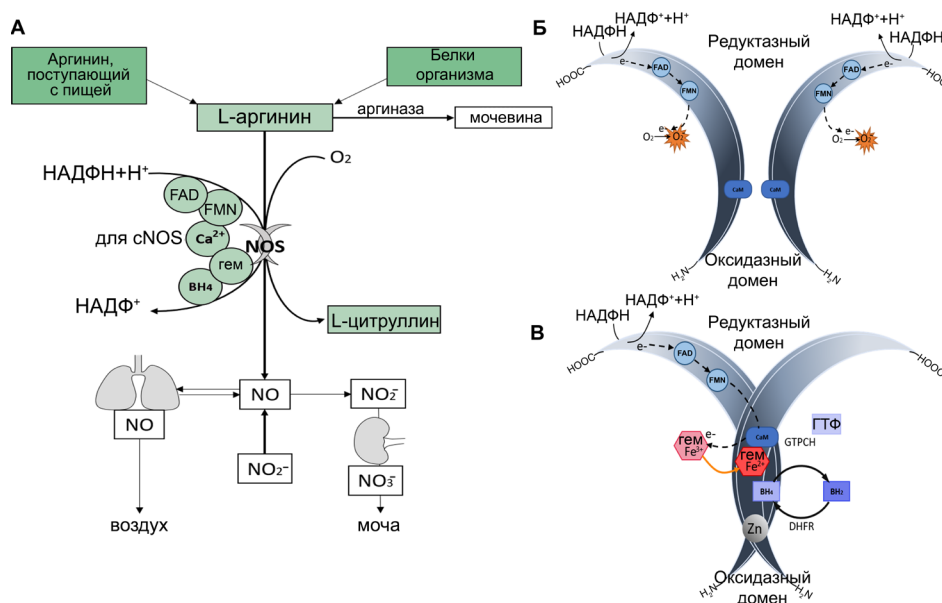


Рисунок 1 – Схематический путь синтеза NO, включающий ферментативные (через NOS; основной путь) и неферментативные пути (А), структура и механизм действия NOS (Б, В)

Примечание. А) Важные источники NO включают активность NOS и восстановление нитрита (NO_2^-) в условиях гипоксии и в кислой среде. NO реагирует с супероксидом (O_2^-) с образованием пероксинитрита (ONOO^-). Супероксид может быть получен из нескольких источников, включая митохондриальную активность и активность НАДФН-оксидазы (NOX). Пероксинитрит – при протонировании или комбинации с диоксидом углерода (CO_2) – дает ряд свободных радикалов, включая диоксид азота (NO_2), а также гидроксил (OH) и карбонат (CO_3^-) радикалы. NO реагирует с металлами, такими как железо (Fe^{II}), с образованием нитрозилов металлов (Fe^{II}NO), таких как тот, который содержится в растворимой гуанилатциклазе. NO также реагирует с молекулярным кислородом с образованием диоксида азота и триоксида азота. Все вместе эти частицы могут участвовать в окислительных (таких как окисление тиола) реакциях, нитрозировании (нитрозирование тиола, RSNO) и нитровании (нитрование тирозина, NO_2 Tyr) биологических мишеней; Б) Мономеры NOS способны переносить электроны от восстановленного НАДФН к ФАД и ФМН и обладают ограниченной способностью восстанавливать молекулярный кислород до супероксида (O_2^-). Мономеры и изолированные домены редуктазы могут связывать кальмодулин (CaM), что усиливает перенос электронов внутри домена редуктазы. Мономеры NOS не способны связывать кофактор BH_4 или субстрат L-аргинин и не могут катализировать выработку NO; В) В присутствии гема NOS может образовывать функциональный димер. Гем необходим для междоменного переноса электронов от флавинов к гему противоположного мономера. Адаптировано [17(а) и 21(б и в)].

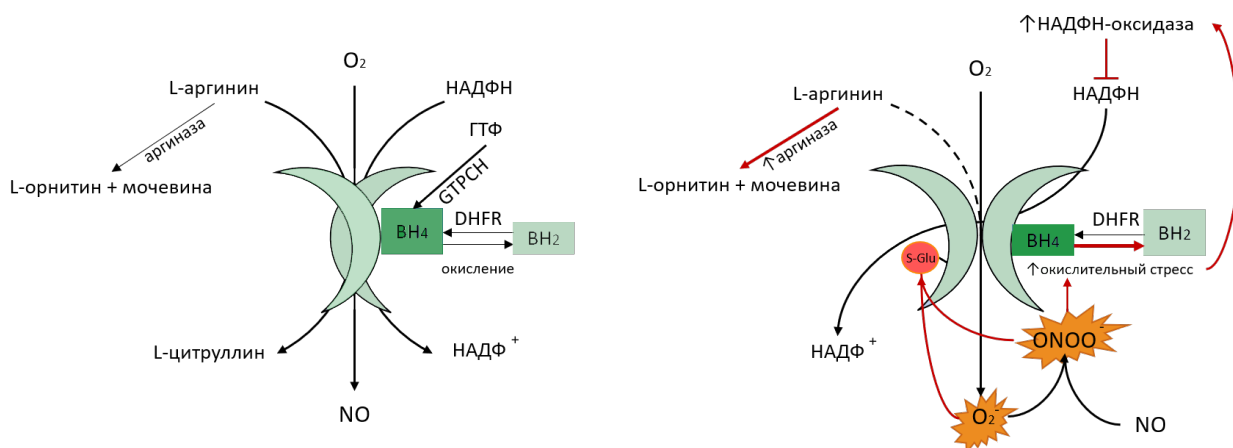


Рисунок 2 – Синтез, рециркуляция и окисление BH_4 как детерминанты разобщения NOS

Примечание. Слева: В нормальных условиях биодоступность BH_4 поддерживается синтезом de novo из гуанозинтрифосфата (ГТФ), в котором стадия ограничения скорости катализируется ГТФ-циклогидролазой (GTPCH) опосредованной дигидрофолатредуктазой (DHFR) рециркуляции 7, 8-дигидриобиптерин (BH_2), первичный продукт неферментативного окисления BH_4 . Справа: «Несвязанные» NOS характеризуются образованием супероксида (O_2^-). Расщеплению NOS способствует снижение биодоступности BH_4 по сравнению с белком BH_2 или NOS. В свою очередь, O_2^- , образованный несвязанными NOS, реагирует с NO, образуя пероксинитрит (ONOO^-), высокореактивный анион, который быстро окисляет BH_4 . Следовательно, состояние разобщения NOS стабилизируется самораспространяющимся окислительным стрессом. В дополнение к этому первичному BH_4 -опосредованному циклу, было показано, что дополнительные механизмы способствуют разобщению, включая снижение биодоступности аргинина, высокие уровни окисленного глутатиона (GSSG) по сравнению с восстановленным глутатионом (GSH) или повышенные концентрации эндогенных ингибиторов NOS L-N-монометиларгинина (L-NMMA, monomethyl-L-arginine) и асимметричный диметиларгинин (ADMA). Адаптировано [60].

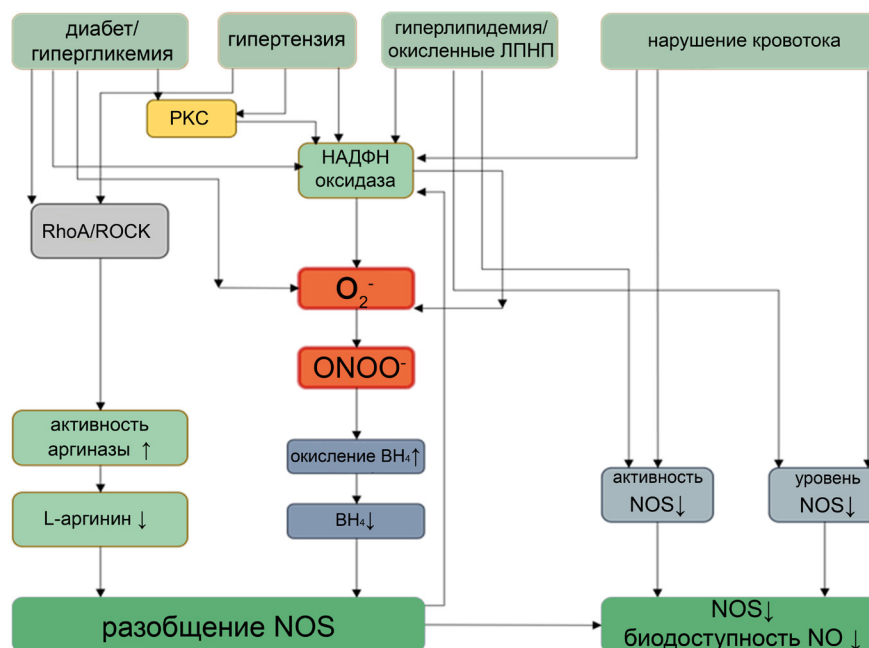


Рисунок 3 – Патологические состояния и механизмы разобщения NOS

Примечание. Гиперхолестеринемия, гипертония, курение и сахарный диабет приводят к активации НАДФН (восстановленной формы никотинамидадениндинуклеотидфосфат) оксидазы, частично по механизму, зависящему от протеинкиназы C (PKC). Сахарный диабет также стимулирует выработку митохондриальных АФК, которые затем запускают активацию НАДФН-оксидазы, которая может увеличивать производство супероксида (O_2^-) митохондриями и ксантиноксидазой. Фермент эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) может разъединяться посредством двух основных механизмов: дефицита кофактора BH_4 или субстрата L-аргинина. O_2^- реагирует с NO, в результате чего образуется пероксинитрит (ONOO-). ONOO- окисляет BH_4 , что приводит к дефициту BH_4 . Дефицит L-аргинина вызывается повышением экспрессии и активности аргиназы, частично за счет RhoA/ROCK-зависимых механизмов. Несвязанная eNOS производит супероксид, тем самым усиливая окислительный стресс. Расщепление eNOS снижает продукцию NO эндотелием, что еще больше усугубляется снижением экспрессии и активности eNOS. Помимо факторов риска на уровне популяции, нарушение кровотока делает бифуркации артерий и боковые ветви склонными к атеросклерозу. Усиленный окислительный стресс и сниженная продукция NO эндотелием вносят значительный вклад в усиление атеросклероза в этих областях. Адаптировано [58].

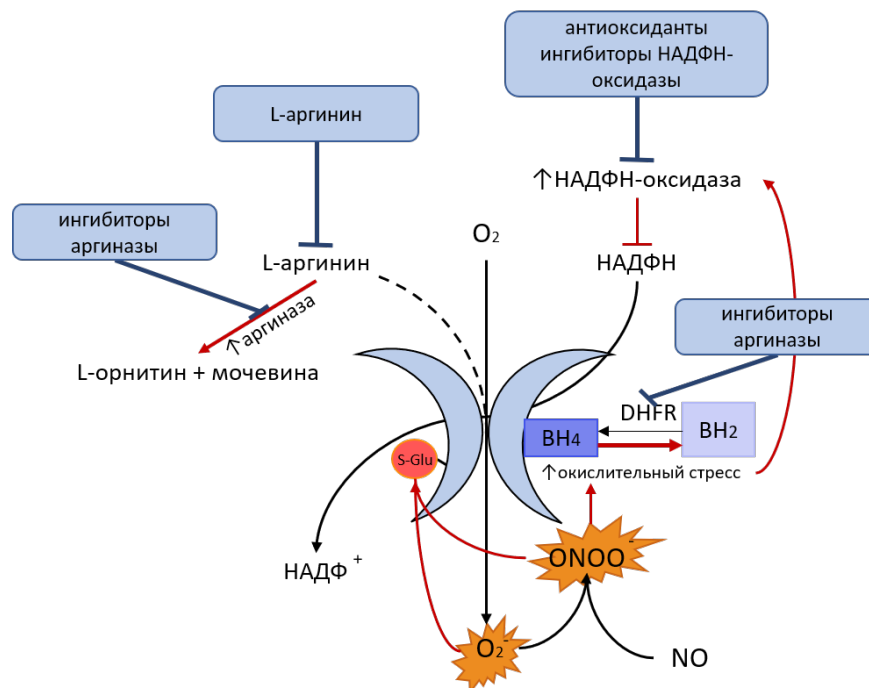


Рисунок 4 – Схематическое изображение известных причин и методов коррекции разобщения NOS в сердечно-сосудистой системе

Примечание. Причины разъединения NOS показаны красным, а методы лечения показаны синим. Супероксид (O_2^-) или пероксинитрит (ONOO-) может окислять BH_4 до BH_2 , что можно предотвратить с помощью антиоксидантов или ингибиторов НАДФН-оксидазы, и нарушать s-глутатионирование (s-Glu). Фолиевая кислота может стимулировать дигидрофолатредуктазу (DHFR), чтобы восстанавливать BH_2 до BH_4 . Ингибирование аргиназы может сохранить уровни L-аргинина, чтобы сделать его доступным для фермента NOS. Адаптировано [59].

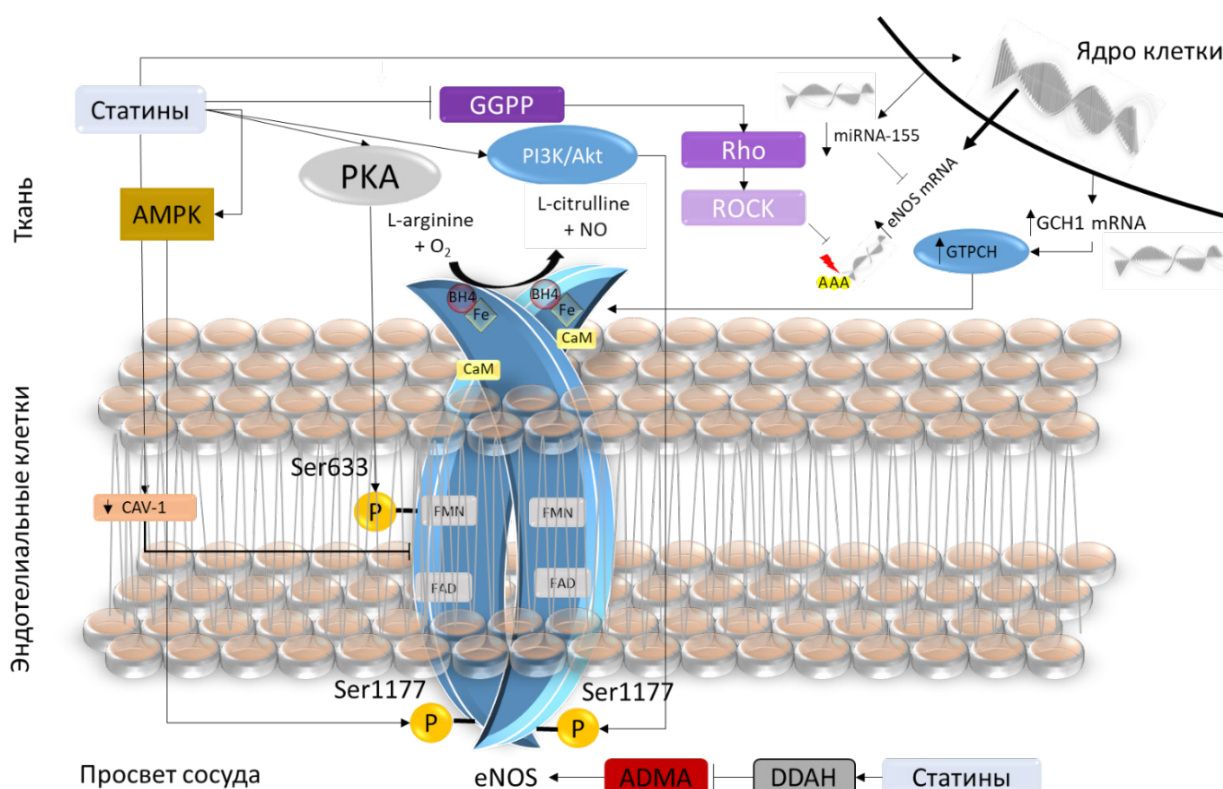


Рисунок 5 – Влияние статинов на eNOS в эндотелиальных клетках

Примечание. Ингибируя синтез мевалоната, статины снижают уровень GGPP, предотвращая активацию Rho/ROCK и стабилизируя мРНК eNOS, тем самым увеличивая экспрессию eNOS. За счет снижения содержания кавеоллина-1 и циркулирующего ADMA, а также увеличения фосфорилирования eNOS в сайтах активации Ser-633 и Ser-1177 посредством AMPK, Akt и PKA статины также увеличивают активность eNOS. Наконец, повышая регуляцию GTPCH, статины увеличивают эндотелиальный BH_4 , наличие и восстановление связи eNOS. GGPP – геранилгеранилпирофосфат; ROCK – Rho-ассоциированная протеинкиназа; GTPCH – гуанозинтрифосфатциклогидролаза; AMPK – протеинкиназа, активируемая аденозинмонофосфатом; PKA – протеинкиназа A; PI3K – фосфатидилинозитид-3-киназа; ADMA – асимметричный диметиларгинин. Адаптировано [77].

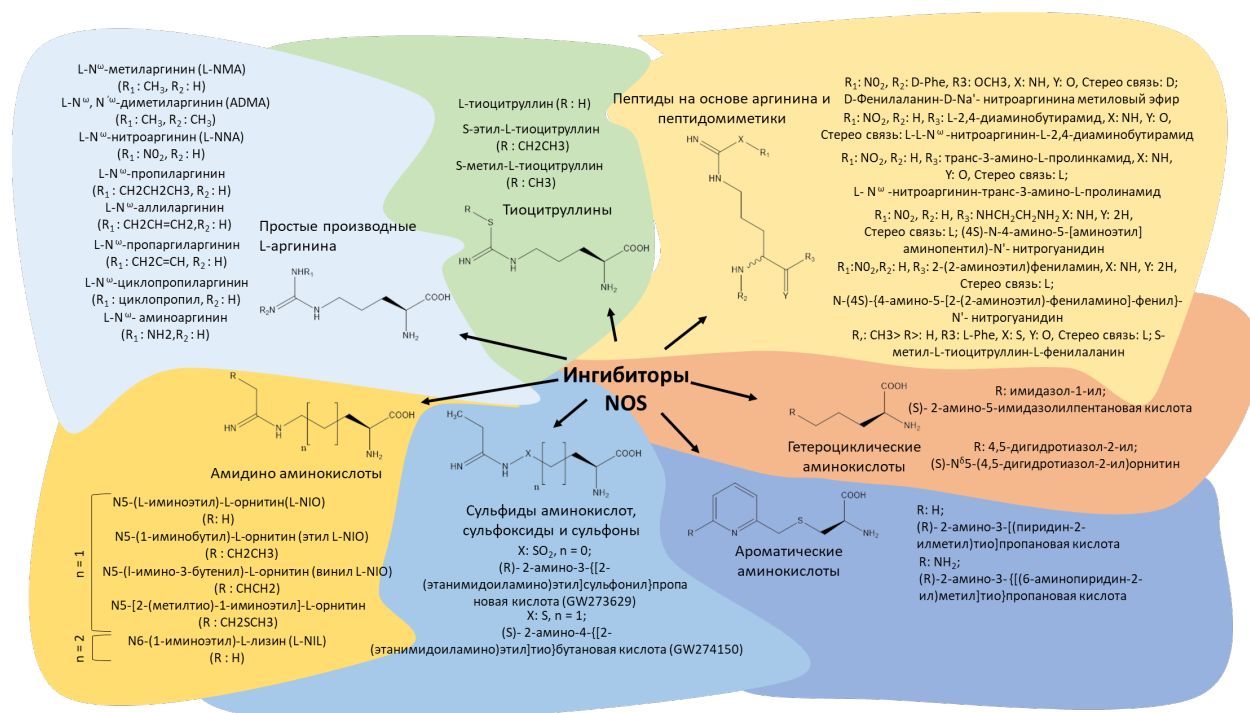


Рисунок 6 – Список наиболее важных ингибиторов на основе аргинина

Примечание: Адаптировано [92].

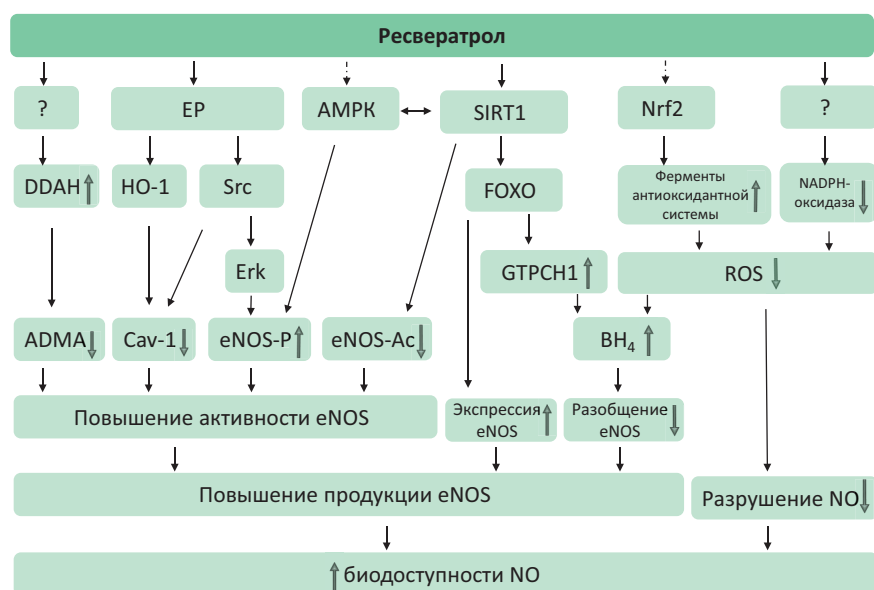


Рисунок 7 – Мишени ресвератрола для предотвращения разобщения NOS (адаптировано 80)

Примечание. Ресвератрол увеличивает выработку NO и предотвращает его распад. Ресвератрол может активировать сиртуин 1 (SIRT1) напрямую (зависимым от субстрата образом) или косвенно (ингибируя фосфодиэстеразы). SIRT1 стимулирует эндотелиальные NOS через деацетилирование, усиливает экспрессию eNOS с помощью деацетилирования фактора транскрипции forkhead box protein O1 (FOXO) и предотвращает разделение eNOS путем повышения активности ГТФ-циклогидролазы I (GTPCH-I), лимитирующий фактор в процессе биосинтеза BH₄. AMPK и ядерный фактор 2, связанный с Nrf2 являются косвенными мишенями ресвератрола. AMPK фосфорилирует eNOS по серину 1177. eNOS может также фосфорилироваться с помощью Erk1/2, который стимулируется путем, включающим рецепторы эстрогена (ER) и тирозинкиназу семейства Src. Кавеолин-1 (Cav-1) представляет собой белок, который негативно регулирует активность eNOS. ADMA – это эндогенный ингибитор eNOS, который расщепляется DDAN. Мишени для активации диметиларгинин диметиламиногидролазы (DDAN) или подавления НАДФН-оксидазы до сих пор не определены. Адаптировано [80].

Таблица 1 – Характеристика различных изоформ NO-синтаз

Наименования	NOS-1 nNOS Нейрональная NOS NOSI	NOS-2 iNOS Индукцируемая NOS NOSII	NOS-3 eNOS Эндотелиальная NOS NOSIII
Размер мономера (человек)	~160 кДа	~131 кДа	~133 кДа
Кофакторы	НАДФН; ФМН; ФАД; BH ₄ ; Кальмодулин; Гем		
Ингибиторы	N-метил-L-аргинин N-нитро-L-аргинин 7-нитроиндазол 1-(2-трифторметилфенил)имидазол L-тиоцитруллин S-метил-L-тиоцитруллин	аминогуанидин S-бензилизотиомочевина 1-(2-трифторметилфенил)имидазол L-N6-(1-иминоэтил)лизин 1400 W	N-метил-L-аргинин N-нитро-L-аргинин N-иминоэтил-L-орнитин 7-нитроиндазол
Внутриклеточная локализация	Цитозоль; Плазматическая мембрана [99]; Митохондрии [100]; Кавеолы [101].	Плазматическая мембрана [102]; Фагосомы [103]; Комплекс Гольджи; Митохондрии.	Плазматическая мембрана; Липидные рафты; Кавеолы [104]; Цитозоль [100].
Клетки	Нейроны [105]; Островки поджелудочной железы [106]; Эндотелиальные клетки; Гладкомышечные клетки [107].	Макрофаги и другие лейкоциты [108]; Гладкомышечные клетки; Кардиомиоциты [35].	Эндотелиальные клетки [109]; Тромбоциты [25].
Тканевая экспрессия	Центральная и периферическая нервная система [105]; Скелетные мышцы [110]; Эндометрий [111]; Macula densa [112].	Сердце; Печень [113]; Гладкая мускулатура; Эндотелий [113].	Эндотелий [114].
Функции	Нейротрансмиссия [105]; Почечные канальцевые клубочковые взаимодействия [115]; Перистальтика кишечника [116].	Бактерицидность; Цитотоксичность; Воспаление [117]; Септический шок [118].	Сосудистая релаксация Снижение адгезии тромбоцитов [119, 120]; Ангиогенез [121].
Вовлеченность в заболевания	Почечные заболевания [115]; Аффективные расстройства [122].	Воспаление	Гипертензия Эндотелиальная дисфункция

NO может негативно регулировать активность iNOS. В стимулированных мышечных макрофагах активность iNOS увеличивается при добавлении гемоглобина, акцептора NO. Добавление доноров NO S-нитрозоацетилпенициллина или S-нитрозоглутамата значительно подавляет активность iNOS, что позволяет предположить, что NO может участвовать в механизме отрицательной обратной связи, но значительно более слабой, чем у других изоформ. Кроме того, активность iNOS не может быть восстановлена в активированных клетках без доноров NO, что свидетельствует о необратимом связывании NO с iNOS. Кинетическое исследование показало, что основным механизмом аутоинактивации iNOS является S-нитрозилирование кластера тетраиолатов цинка, которое вызывает потерю цинка, необратимую диссоциацию димера iNOS и последующую потерю активности. Восстановители могут защитить iNOS от этой инактивации, предполагая, что S-нитрозилирование действительно было основным путем инактивации [37].

Митохондриальная NO-синтаза

Несмотря на то, что NO – молекула, обладающая высокой диффузионной способностью, которая может проникать через мембраны и достигать митохондрий, существуют также свидетельства того, что митохондрии вырабатывают NO [38] и что существует митохондриальная NOS. Однако идентичность этой митохондриальной NOS все еще обсуждается [39, 40]. Несколько исследований показали, что в различных тканях, таких как скелетные мышцы [14], сердца [42], почки, мозг [42] и печень [41, 42], присутствуют NOS (которую возможно отнести к митохондриальной) с положительной иммунореактивностью на антитела против iNOS [41], eNOS и nNOS. Кроме того, Gao S. и его коллеги [43] смогли лучше определить локализацию eNOS на цитоплазматической поверхности внешней митохондриальной мембраны в эндотелиальных клетках [43]. Elfering S.L. и его коллеги охарактеризовали последовательность митохондриальной NOS крысы как изоформу nNOS α , которая может быть модифицирована ацилированием, чувствительна к кальцию и имеет сайты фосфорилирования [44]. Они предположили, что эти посттрансляционные модификации могут быть ответственны за нацеливание NOS на внутреннюю митохондриальную мембрану.

Подтверждая результаты Elfering S.L. с соавт., Kapał A.J. с соавт. показали, что митохондрии, выделенные из сердца мышей, у которых была нокаутрована изоформа nNOS α , не производили NO, в то время как eNOS - / - и iNOS - / - нокаутировали мышей, сохраняя продукцию NO в изолированных митохондриях [45]. Lacza Z. и его коллеги смогли обнаружить продукцию NO, активность NOS и низкие количества белка eNOS в митохондриях, но активность NOS не была нарушена у мышей с нокаутом eNOS [46]. Кроме того, на продукцию NO в митохондриях не влияли мыши с нокаутом по nNOS и iNOS.

Venkatakrishnan P. и его коллеги не смогли обнаружить активность или экспрессию эндотелиальных и нейрональных изоформ NOS в митохондриях печени крыс, ставя под сомнение существование митохондриальной NOS, по крайней мере, в печени [47].

Независимо от этого разногласия по поводу существования или идентичности митохондриальной NOS, недавние исследования показывают более тесную взаимосвязь между митохондриальной NOS и дыхательной цепью. Parihar M.S. и его коллеги предположили, что комплекс I дыхательной цепи регулирует активность митохондриальной NOS, демонстрируя митохондриальную активность NOS, связанную с комплексом I, в изолированных митохондриях печени и мозга крыс [48]. Кроме того, исследование препаратов митохондрий сердца продемонстрировало, что фракции, обогащенные комплексом I, имеют более высокую митохондриальную NOS (изоформа nNOS α), что свидетельствует о том, что митохондриальная NOS физически близка к комплексу I [49].

Противоречивые результаты относительно существования и идентичности mtNOS можно объяснить несколькими методологическими проблемами, которые были подробно рассмотрены Brookes P.S. [50]. Некоторые из этих проблем включают чистоту митохондрий, присутствие других типов клеток в тканях (например, эндотелиальные клетки сосудов, воспалительные клетки), обнаружение продукции NO в митохондриях и иммунодетекцию изоформ NOS. Если mtNOS действительно существует, несмотря на методологические проблемы, идентичность mtNOS также может быть связана с тканью происхождения, что может объяснить несогласованность идентифицированной изоформы, например, mtNOS может быть изоформой нейронов в головном мозге, а iNOS – в мозге и печени.

Существование mtNOS может быть подтверждено релевантностью NO в контроле митохондриального дыхания, так как при производстве в митохондриях NO будет иметь быстрый и легкий доступ к своей мишени, цитохром оксидазе, которая ингибируется NO [51]. Однако также утверждается, учитывая высокую способность NO к диффузии, не обязательно, чтобы он вырабатывался вблизи места своего действия [52]. Например, NO может продуцироваться eNOS в эндотелиальных клетках сосудов или eNOS, расположенным на поверхности цитозоля внешней митохондриальной мембраны, затем диффундировать через другие компартменты, достигая дыхательной цепи [52].

Рецепторы оксида азота

Наиболее важным физиологическим сигнальным путем, стимулируемым NO, является активация растворимой гуанилатциклазы и образование циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ). Растворимая гуанилатциклаза (рГЦ) является ключевым белком в регуляции множества физиологических функций у млекопитающих. Это основной рецептор NO, играющий центральную роль в регуляции АД, заживлении ран, формировании памяти и других ключевых

физиологических процессах. Участие рГЦ все чаще обнаруживается в различных патофизиологических процессах [53].

Поскольку константа скорости ассоциации NO с гемовыми центрами обычно очень высока по сравнению с другими потенциальными мишенями, даже низкие, наномолярные, концентрации NO достаточны для активации рГЦ. Быстрые реакции между NO и мишенями с такой кинетикой ограничивают альтернативные процессы передачи сигналов, которые, в противном случае, могут быть вредны для функционирования клетки. При стимуляции NO рГЦ генерирует циклический гуанозинмонофосфат из гуанозин-5'-трифосфата и активирует протеинкиназа G-зависимую передачу сигналов, необходимую для различных сигнальных каскадов в нескольких типах клеток. Хорошо известно, что нарушение регуляции передачи сигналов рГЦ приводит к дисфункции сердечно-сосудистой, нервной и желудочно-кишечной систем [54].

Физиологически значимый гетеродимер рГЦ млекопитающих состоит из субъединиц $\alpha 1$ и $\beta 1$ и экспрессируется в большинстве типов клеток и тканей; однако были идентифицированы две другие субъединицы рГЦ, $\alpha 2$ и $\beta 2$, открыты смешанные гетеродимеры, в частности $\alpha 2\beta 1$, который экспрессируется в головном мозге, плаценте, селезенке и матке.

Обе субъединицы α и β содержат домен гомологии циклазы и относятся к семейству циклаз класса III. Поскольку активный сайт рГЦ находится на границе гетеродимера, возможны два активных центра, но при соединении субъединиц образуются каталитический и псевдосимметричный карманы [55].

Различные физиологические исследования показали, что субъединица $\beta 1$ гетеродимера необходима, но не достаточна для правильной передачи сигналов рГЦ; обе субъединицы $\alpha 1$ и $\alpha 2$ могут гетеродимеризоваться с субъединицей $\beta 1$ с образованием функционального белка. Было обнаружено, что консервативный гистидин на субъединице $\beta 1$ координирует гемовую составляющую, которая предпочтительно связывает NO и монооксид углерода (CO), а не кислород (O_2). Структурные изменения, вызванные связыванием NO, активируют каталитический домен белка рГЦ, что вызывает вазорелаксацию [56].

Выяснение роли NOS в физиологических и патофизиологических процессах в организме. Разобщение NOS как основа патофизиологических состояний

В физиологических условиях eNOS продуцирует NO, который представляет собой ключевой вазодилаторный фактор эндотелия. Однако при патологических условиях, связанных с окислительным стрессом, eNOS может перестать функционировать. Окислительный стресс способствует эндотелиальной дисфункции, в первую очередь, из-за быстрой инактивации NO посредством окисления избытком супероксида. На втором этапе постоянный окисли-

тельный стресс делает eNOS несвязанной, вследствие чего супероксид производится за счет NO. Дефицит кофактора eNOS тетрагидриобиптерина (BH_4), дефицит субстрата eNOS, L-аргинина, и S-глутатионилирование eNOS, вероятно, являются основными причинами разобщения eNOS. Пероксинитрит и супероксид могут окислять BH_4 , что приводит к дефициту BH_4 . Продукция АФК из несвязанных eNOS была показана на мышинных моделях атеросклероза, а также у пациентов с гиперхолестеринемией, атеросклерозом, гипертонией, сахарным диабетом и у людей, длительно употребляющих никотин [57].

В условиях атеросклероза и сосудистых заболеваний биодоступность NO в сосудистой сети снижается. Все известные факторы риска сердечно-сосудистых заболеваний сопровождаются снижением биодоступности NO в результате снижения его выработки и усиления инактивации супероксидом.

Таким образом, снижение продукции NO не является результатом уменьшения экспрессии eNOS. Напротив, экспрессия eNOS компенсаторно усиливается при сосудистых заболеваниях. Однако этот механизм компенсации часто бесполезен, потому что активность eNOS ингибируется или фермент eNOS становится разобщенным (нерабочим) [58].

Молекулярные механизмы разобщения NOS

Наиболее значимой причиной разобщения NOS является потеря критически значимого кофактора BH_4 . Он может синтезироваться двумя путями: в трехступенчатом процессе от гуанинтрифосфата (ГТФ) до BH_4 и так называемым «спасательным путем», который рециркулирует окисленный 7,8 дигидриобиптерин обратно в BH_4 с использованием рециклирующего фермента дигидрофолатредуктазы (DHFR, dihydrofolate reductase). Окислительный стресс играет существенную роль в истощении пулов клеточного BH_4 , что приводит к разобщению. Супероксид может непосредственно окислять BH_4 до дигидриобиптерина (BH_2) и, следовательно, дестабилизировать димер NOS, что приводит к разобщению. Это, по-видимому, является основной причиной разобщения NOS во время гипертонии и ишемической реперфузии, поскольку повышенный уровень супероксида соответствует уменьшению отношения BH_4/BH_2 и последующему разъединению NOS. Окислительный стресс также может влиять на биодоступность BH_4 не только за счет окисления, но и за счет прямого снижения экспрессии DHFR, тем самым снижая активность «спасательного пути» [59].

Прямое окисление BH_4 супероксидом происходит относительно медленно, но BH_4 быстро окисляется до BH_2 пероксинитритом, высокореактивным анионом, образующимся при реакции супероксида с NO. Пероксинитрит также вызывает значительные повреждения клеток за счет нитрования тиоловых и гидроксильных групп боковой цепи аминокислот, тем самым нарушая ферментативную функцию.

Последствия разобщения NOS включают: снижение образования NO *de novo*; связывание биоактив-

ного NO супероксидными анионами посредством образования пероксинитрита; клеточное повреждение, опосредованное супероксидом и пероксинитритом; опосредованное пероксинитритом окисление BH_4 до BH_2 , приводящее к дальнейшему распространению разобщения NOS.

Таким образом, разобщение NOS – это самоусиливающийся биохимический процесс, вызванный окислением BH_4 . Окисление BH_4 из-за несвязанного eNOS-зависимого окислительного стресса наблюдалось как *in vitro*, так и *in vivo*. В этих экспериментах разобщение индуцировалось увеличением экспрессии eNOS в условиях стабильной экспрессии ГТФ-циклогидразы (GTPCH-I), эффективно снижая соотношение BH_4 и eNOS. Если все другие переменные остаются постоянными, результирующее окисление BH_4 до BH_2 может быть связано только с образованием супероксида разьединенными NOS. Клеточный супероксид также продуцируется рядом других механизмов, включая НАДФН-оксидазу, ксантиноксидазу окислительно-восстановительные процессы. При патологии окислительный стресс может провоцировать окисление BH_4 , тем самым иницируя или поддерживая разобщение NOS. Избыточное количество супероксида, образующееся в результате начального окисления BH_4 и разобщения NOS, будет стимулировать цикл клеточного повреждения, дальнейшее окисление BH_4 (окисление BH_4 стабилизирует несвязанные субъединицы NOS, которые продолжают производить АФК и биохимическую стабилизацию активности несвязанной субъединицы NOS). Прерывание этого процесса связи является многообещающей стратегией лечения широкого спектра сердечно-сосудистых заболеваний, вызванных или усугубляемых разобщением NOS (Рис. 2) [60, 61].

Пероксинитрит приводит к разобщению NOS. Хотя пероксинитрит может непосредственно окислять BH_4 *in vitro*, он также напрямую может влиять на сам фермент, что также приводит к разобщению: пероксинитрит высвобождает цинк из цинк-тиолатного кластера и разрушает димер NOS (Рис. 3) [59].

S-глутатионилирование – это обратимая посттрансляционная модификация, которая присоединяет глутатион к восстановленным остаткам цистеина. Чаще всего это происходит во время окислительного стресса, поскольку eNOS выступает в качестве одной из основных мишеней для S-глутатионилирования. Установлено, что eNOS-зависимая продукция NO и супероксида модулируется его S-глутатионилированием, что указывает на то, что интенсивное S-глутатионилирование коррелирует со снижением активности NOS и увеличением продукции супероксида. Усиление окислительного стресса вызывает пропорциональное увеличение количества S-глутатионилированной eNOS, что также указывает на то, что производство супероксида по принципу восходящей регуляции является триггером для разобщения eNOS [59].

Таким образом, S-глутатионилирование разъе-

няет eNOS, переключая его с NO на образование АФК, посредством присоединения глутатиона к остаткам цистеина между ФМН-связывающим и ФАД-связывающим доменами: это приводит к разобщению фермента и продукции свободных радикалов O_2^- . Окислительный стресс запускает S-глутатионилирование eNOS в эндотелиальных клетках и интактных сосудах. Кроме того, S-глутатионилирование увеличивается при вазоконстрикции, что снижает эндотелий-зависимую вазодилатацию. Принимая во внимание важность опосредованной NO и eNOS эндотелиальной дисфункции при таких заболеваниях, как инфаркт, инсульт, диабет и рак, идентификация этого нового пути передачи окислительно-восстановительных сигналов позволяет по-новому взглянуть на терапевтические подходы к их профилактике или терапии [62].

Препараты для предотвращения разобщения NOS

Как уже отмечалось выше, разобщение NOS – это один из основных факторов в развитии различных заболеваний и, следовательно, перспективная цель для фармакологического вмешательства. Было предложено много подходов, чтобы попытаться восстановить NOS при различных заболеваниях, включая: блокирование продукции АФК в восходящем направлении, введение BH_4 , введение фолиевой кислоты для рециркуляции BH_2 в BH_4 и введение L-аргинина (Рис. 4).

BH_4

Снижение биодоступности BH_4 с последующим разъединением eNOS оказывает значительное влияние на патогенез эндотелиальной дисфункции, которая является признаком повреждения сосудов при сердечно-сосудистых патологиях, включая гипертензию, гиперлипидемию и диабет [63]. Внутриклеточные соотношения BH_4 / eNOS (и BH_4 и других изоформ NOS) остаются плохо определенными, из-за чего неясно, достаточно ли внутриклеточного дефицита BH_4 для индукции разобщения eNOS. Соотношение BH_4/BH_2 и абсолютная молярная концентрация BH_4 являются ключевыми детерминантами связывания eNOS *in vivo*. Степень окисления BH_4 , накопления BH_2 и продукции супероксида напрямую коррелируют с внутриклеточным соотношением eNOS/ BH_4 . Посредством механизмов, независимых от eNOS, таких как прямое поглощение активных форм кислорода, BH_4 может оказывать существенное влияние на уровни выработки клетками активных форм кислорода [64].

Таким образом, восполнение внутриклеточного BH_4 можно считать перспективным подходом для стабилизации NOS. Однако есть причины, ограничивающие возможность клинического применения этого подхода. Пероральное введение избытка BH_4 может быть неэффективно если соотношение изоформ NOS не сбалансировано: слишком большое количество BH_4 может активировать iNOS в условиях воспаления, усугубляя патофизиологию этого процесса.

Перорально вводимый BH_4 , вероятно, окисляется и его необходимо восстанавливать, но попытки усилить этот процесс повторного восстановления путем объединения BH_4 с антиоксидантами (витамин С) не привели к повышению клинической эффективности этой комбинации. BH_4 уже одобрен Food and Drug Administration (FDA, <https://www.fda.gov/>) в качестве терапевтического средства для лечения фенилкетонурии, дефицита фенилаланингидроксилазы, который можно частично компенсировать путем введения BH_4 . Дигидрохлорид сапроптерина (Kuvan®, BioMarin, Tiburon, CA, www.vidal.ru) представляет собой синтетическую версию BH_4 , которая в настоящее время используется для лечения пациентов с фенилкетонурией [65, 66].

Аналог BH_4 соединение 6-ацетил-7,7-диметил-5,6,7,8-тетрагидроптерин (ADDP), стабильное соединение, растворимое как в полярных, так и в органических растворителях. ADDP может диффундировать из плазмы через клеточные мембраны и вызывать расширение сосудов, стимулируя активность eNOS [67].

Метформин может ослаблять окислительное повреждение эндотелиальных клеток за счет повышения уровня ГТФ циклогидралазы-I (GTPCH-I) и BH_4 и, тем самым, предотвращая разобщение eNOS. Метформин также подавляет уровень субъединицы НАДФН-оксидазы p47-phox, тем самым уменьшая образование АФК и окисление BH_4 . Эти защитные эффекты метформина, частично опосредованы активацией сигнального пути аденозинмонофосфат-активируемой протеинкиназы (AMPK, adenosine monophosphate-activated protein kinase) [68].

Ингибиторы аргиназы

Роль чрезмерной экспрессии и/или активности аргиназы и её нижестоящих мишеней в сердечно-сосудистой дисфункции и травмах была хорошо установлена. Фармакологическое воздействие на конкретные компоненты пути аргиназы/орнитина перспективно в качестве терапии сердечно-сосудистых заболеваний [69].

Уреогидролаза аргиназа – это марганецсодержащий фермент, который катализирует заключительный этап орнитинового цикла путем преобразования L-аргинина в L-орнитин и мочевины. Две изоформы этого фермента имеют схожие механизмы действия и продуцируют одни и те же метаболиты. Гомология их аминокислотных остатков составляет более 60%, а области, важные для функции фермента, гомологичны на 100%. Кроме того, обе изоформы вовлечены в нарушение регуляции функции NOS [70].

Индукцированное аргиназой разобщение eNOS приводит к увеличению продукции АФК, что способствует эндотелиальной дисфункции и повышению жесткости сосудов. Увеличение уровня аргиназы может снижать концентрацию L-аргинина и, как было показано, вносит свой вклад в патофизиологию болезней системы кровообращения [71].

Доклинические исследования показали, что дополнительное введение L-аргинина может улучшить эректильную дисфункцию, предотвратить или снизить выраженность эндотелиальной дисфункции. Однако некоторые исследования на животных и людях не выявили никакой пользы или усиления неблагоприятных последствий от хронического введения L-аргинина. Возникающие побочные эффекты, вероятно, связаны с контррегулирующими эффектами L-аргинина в отношении увеличения экспрессии/активности аргиназы, что может снизить доступность L-аргинина для NOS. В условиях чрезмерной активности аргиназы будет происходить конкурентное с NOS за L-аргинин, вызывая разобщение фермента. Также повышенное образование активных форм кислорода и ключевых медиаторов воспаления способствует патологическому повышению активности аргиназы [71].

Таким образом, несколько аминокислот ингибируют аргиназу, в том числе: L-орнитин, L-лейцин, L-валин, L-лизин, L-изолейцин и L-норвалин. L-Орнитин является наиболее сильнодействующей из перечисленных. Кроме того, L-цитруллин увеличивает образование NO, но также является аллостерическим ингибитором аргиназы [71].

Исследования El-Bassossy H.M. и соавт. показали, что ингибирование аргиназы цитруллином, норвалином или орнитином облегчает гипертензию, связанную с метаболическим синдромом прямыми и косвенными защитными механизмами. Прямой механизм заключается в поддержании эндотелий-зависимой релаксации и генерации NO, в то время как косвенный реализуется через ингибирование инсулинорезистентности и гипертриглицеридемии [72]. Орнитин подавляет фермент аргиназу, конкурируя с её субстратом (L-аргином) на активных сайтах фермента. L-норвалин является неконкурентным ингибитором фермента аргиназы, а L-цитруллин является её аллостерическим ингибитором.

L-норвалин (или 2-аминопентановая кислота) – это непротеиногенная аминокислота и изоформа обычной аминокислоты валина, которая интенсивно исследовалась в ранних энзимологических исследованиях. Структурное сходство с L-орнитином придает субстанции способность ингибировать аргиназу по принципу отрицательной обратной связи. Кроме того, *in vitro* были продемонстрированы противовоспалительные свойства L-норвалина через механизм ингибирования рибосомальной протеинкиназы S6-киназы $\beta 1$. Следует отметить, что ингибирование аргиназы перспективно для снижения риска и частоты сердечно-сосудистых заболеваний [73].

Статины ингибируют ГМГ-КоА редуктазу которая катализирует превращение ГМГ-КоА в мевалоновую кислоту, ограничивая биосинтез холестерина в печени. Помимо ингибирования синтеза холестерина, статины также блокируют синтез промежуточных изопреноидов, таких как фарнезилпирофосфат (FPP, farnesyl pyrophosphate) и геранилгеранилпирофос-

фат (GGPP, geranylgeranyl diphosphate). FPP и GGPP служат в качестве важных липидных компонентов для посттрансляционной модификации различных белков, включая гетеротримерные G-белки и небольшие ГТФ-связывающие белки, принадлежащие к семейству Ras, Rho, Rap и Rab ГТФ-аз. Изопренилирование имеет решающее значение для внутриклеточного транспорта и функции малых ГТФ-связывающих белков. Модификация с помощью FPP необходима для правильной локализации белков семейства Ras, тогда как GGPP необходим для белков семейства Rho, Rab и Rap. Однако некоторым Rho ГТФ-азам требуется как фарнезилирование, так и геранилгеранилирование для правильного функционирования и внутриклеточной локализации. Ингибируя синтез мевалоната, статины подавляют синтез промежуточных изопреноидов, тем самым предотвращая изопренилирование малых ГТФаз, что приводит к ингибированию этих сигнальных молекул. Интересно, что некоторые холестерин-независимые или «плейотропные» эффекты статинов могут быть связаны со способностью статинов блокировать синтез промежуточных изопреноидов. [74, 75].

Способность статинов увеличивать экспрессию и активацию eNOS может быть важным механизмом, с помощью которого статины улучшают эндотелиальную функцию и снижают уровень холестерина (Рис. 5).

Было показано, что геранилгеранилирование ГТФ-азы Rho приводит к подавлению регуляции eNOS в эндотелиальных клетках; введение статинов ингибировало образование GGPP и, следовательно, приводило к усилению экспрессии eNOS, которая не наблюдалась при совместной инкубации с GGPP. Также было показано, что повышенный уровень эндогенных липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) отрицательно влияет на экспрессию mPHEK eNOS в эндотелиальных клетках пупочной вены человека (HUVEC, Human umbilical vein endothelial cells), причем этот эффект, на посттранскрипционном уровне, нейтрализовался после введения симвастатина. Механизм, по которому статины увеличивают стабильность mPHEK eNOS, заключается в повышении полиаденилирования mPHEK eNOS из-за изменений в актиновом цитоскелете, вызванных ингибированием Rho. Кроме того, обработка статинами HUVECs, старение которых было индуцировано пероксидом водорода (H_2O_2), активирует путь фосфатидилинозитид-3-киназы (PI3K, phosphoinositide 3-kinase)/Akt и усиливает экспрессию eNOS. Фактор некроза опухоли альфа (TNF α), является мощным воспалительным стимулом, который активирует микро-РНК miR-155 и, соответственно, mPHEK eNOS. Важно отметить, что его (TNF α) активация ослаблялась симвастатином, но положительное действие статина отменялось совместной инкубацией с мевалонатом или GGPP [76].

В дополнение к увеличению экспрессии eNOS на транскрипционном и посттранскрипционном уровнях, статины, на посттрансляционном уровне, усиливают активность eNOS, которая обладает несколькими

ми сайтами фосфорилирования по остаткам серина/треонина. Воздействие на HUVEC флувастатина увеличивает фосфорилирование eNOS в сайтах активации Ser-633 и Ser-1177 посредством протеинкиназы A (PKA) и пути, опосредованного PI3K/Akt соответственно. Статин-опосредованная индукция фосфорилирования eNOS по Ser-1177 зависит от рекрутирования Akt в комплекс eNOS в эндотелиальных клетках (белок теплового шока-90). Аторвастатин в эндотелиальных клетках увеличивает фосфорилирование eNOS по Ser-633 посредством аденозинмонофосфат-активируемой протеинкиназы (AMPK). Более того, инкубация *ex vivo* мезентериальных резистентных артерий крыс с симвастатином индуцирует быстрое AMPK-опосредованное фосфорилирование eNOS по Ser-1177. Помимо модуляции фосфорилирования, статины также увеличивают активность eNOS на посттрансляционном уровне, вызывая его диссоциацию от кавеолина-1. Аторвастатин снижает содержание кавеолина-1 и активирует eNOS в ЭК независимо от наличия или отсутствия холестерина ЛПНП [77].

Статины действуют на нескольких уровнях, увеличивая как активность eNOS, так и стабилизируя ее димеры. Воздействие на HUVEC церивастатина или флувастатина приводит к усилению экспрессии GTPCH и увеличивает биодоступность BH_4 , что приводит к улучшению связывания eNOS. Кроме того, статины предотвращают окисление тетрагидробиоптерина до тригидробиоптерина (BH_4 до BH_3). Результатом этих процессов является снижение окислительного стресса в эндотелиальных клетках и улучшение функции eNOS [76].

Асимметричный диметиларгинин (ADMA) выступает в роли эндогенного ингибитора eNOS. ADMA вырабатывается как побочный продукт метаболизма белков за счет метилирования остатков L-аргинина, его продукция значительно увеличивается за счет ЛПНП в эндотелиальных клетках, метаболизируется ферментом диметиларгинин диметиламиногидролазой (DDAH); в физиологических условиях выводится с мочой. Из-за близкого сходства по структуре с L-аргинином, ADMA подавляет активность eNOS либо посредством ингибирования клеточного поглощения L-аргинина, либо путем прямого конкурентного ингибирования связывания с eNOS [78].

Существует несколько гипотез о том, как статины влияют на уровень ADMA. Один из них касается ингибирования ADMA-индуцированной воспалительной реакции, модулируемой путём митоген-активируемой протеинкиназы (MAPK) в человеческих эндотелиальных клетках. Статины активируют белок, связывающий элемент ответа на стерол фактора транскрипции (SREBP) посредством снижения содержания холестерина в мембране. Этот фактор специфически усиливает экспрессию более 30 генов, связанных с синтезом и поглощением жирных кислот, фосфолипидов, холестерина и триглицеридов. Одна из его изоформ – белок, связывающий регуляторный элемент стерола 2 (SREBP-2, Sterol regulatory

element-binding protein 2) увеличивает транскрипцию пропротеинконвертазы субтилизин/кексин типа 9 (PCSK9, proprotein convertase subtilisin/kexin type 9). Статины повышают уровень как мПНК PCSK9, так и LDLR посредством активации стерол-опосредованного SREBP-2, важного активатора транскрипции и активности DDAH (Рис. 6) [79].

Ресвератрол

Ресвератрол (3,5,4'-тригидрокси-транс-стильбен) представляет собой полифенол-фитоалексин, присутствующий в различных видах растений, включая *Veratrum grandiflorum* (Maxim. ex Baker) O. Loes (морозник белый), *Polygonum cuspidatum* Siebold & Zucc. (японский спорыш), *Vitis vinifera* L. (виноград), *Arachis hypogaea* L. (арахис) и *Morus rubra* L. (шелковица). Название «ресвератрол» произошло от его источника; соединение представляет собой производное резорцина из видов рода *Veratrum*.

Молекулярные мишени ресвератрола включают те, которые непосредственно взаимодействуют с ним и другие, которые модулируются косвенно (например, через изменение уровней экспрессии). Для его воздействия на eNOS особое значение имеют следующие мишени: НАД⁺ – зависимый гистон-деацетилазный сиртуин 1 класса III (SIRT1, silent information regulator 1); АМФ-активированная протеинкиназа (АМПК); производный от ядерного фактора эритроидный 2 – зависимый фактор-2 (Nrf2, nuclear factor E2-related factor 2); рецепторы эстрогена (ER, estrogen receptor).

Часть эффектов ресвератрола в отношении сердечно-сосудистой системы опосредуется эндотелиальным NO. Ресвератрол усиливает выработку NO с помощью нескольких механизмов и предотвращает распад NO за счет снижения окислительного стресса (Рис. 7).

Активаторы различных изоформ NOS

Кальция добезилат (Doxium 1)

Кальция добезилат (CaD) – широко используется в качестве ангиопротекторного средства для лечения сосудистых заболеваний, подавляет агрегацию тромбоцитов, образование тромбов, повышенную проницаемость капилляров, снижает их хрупкость, повышенную вязкость крови.

Специфическое свойство добезилата – умеренное повышение активности eNOS с незначительным или без влияния на активность iNOS, что свидетельствует о его перспективности для лечения сосудистых заболеваний, особенно вызванных нарушением секреции NO в эндотелии, в том числе при длительной гипергликемии [81].

Механизм действия кальция добезилата на экспрессию eNOS реализуется несколькими путями.

В результате исследования Zhou Y. с соавт. [84] молекулярных и клеточных механизмов, лежащих в основе защитных эффектов CaD, было установлено действие добезилата кальция на пентраксин 3 (PTX3).

Данный белок представляет собой важный компонент гуморального иммунитета и секретируется различными клетками, в том числе эндотелиальными, мононуклеарными макрофагами, фибробластами, адипоцитами, дендритными и гладкомышечными после стимуляции воспалительного ответа. Высокие уровни PTX3 в плазме сопряжены со многими заболеваниями, связанными с эндотелиальной дисфункцией (сахарный диабет, артериальная гипертензия, хронические заболевания почек). PTX3 препятствует фосфорилированию eNOS по серину 1177, снижая продукцию NO, что приводит к эндотелиальной дисфункции.

PTX3 индуцирует дисфункцию и морфологические изменения в эндотелиальном слое через путь Р-селектин/матриксная металлопротеиназа-1, что препятствует отделению eNOS от caveолина-1, что приводит к нарушению сигнализации NO [82]. В другом исследовании также подтверждается, что PTX3 ингибирует путь NOS/NO, ингибируя фосфорилирование eNOS и, следовательно, не вызывая нужное для активации отслоение от caveолина-1 [83].

Таким образом, добезилат кальция может ингибировать экспрессию PTX3, изменяя путь IKK/I κ B/NF- κ B, тем самым улучшая эндотелиальную дисфункцию на клеточном уровне [84].

Также эндотелиальные клетки, для поддержания их различных функций (дифференцировки, проницаемости и экспрессии NOS) и выживания, нуждаются в факторе роста эндотелия сосудов (VEGF-A, vascular endothelial growth factor A) [85], однако избыточное количество этого фактора вызывает их повреждение, увеличение проницаемости клубочков и воспаление. Соответствующий баланс экспрессии, связывания и передачи сигналов VEGF необходим для поддержания здоровья клубочков и предотвращения гломерулосклероза и разрежения. В условиях патологии этот баланс нарушается [86].

Сниженный ответ NO, несмотря на высокие концентрации VEGF в сосудистой сети, был назван «разобщением» eNOS и VEGF, что приводит к нарушению клеточного ответа и интенсификации течения патологического процесса. Помимо позитивного влияния на eNOS, на молекулярном уровне добезилат кальция также снижает окислительный стресс и ингибирует факторы роста, такие как фактор роста фибробластов (FGF, fibroblast growth factor) и VEGF [87].

CavNOxin

CavNOxin представляет собой синтетический пептид из 20 аминокислот каркасного домена caveолина с тройной заменой аланина, слитый с пептидом пенетратином, для свободного проникновения в клетки.

CavNOxin увеличивает уровни NO, снижает тонус сосудов и снижает среднее АД у мышей дикого типа, однако эффект теряется у животных с нокаутом гена или caveолина-1, что указывает на его специфичность для caveолина-1.

Хроническое введение CavNOxin снижает выраженность атеросклероза у мышей с нокаутом по аполипопротеину E (ApoE, apolipoprotein E), получавших высокожировую диету, и у мышей с диабетом и атеросклерозом, при этом потеря eNOS генетически ослабляет его действие. Эти результаты предполагают, что CavNOxin может снижать ингибирующее действие кавеолина на функцию eNOS, что позволяет усилить эндогенный биосинтез NO. Данные генетических исследований с использованием трансгенных мышей с эндотелиально-специфической экспрессией F92A CAV1, подтверждают, что регулируемая экспрессия модифицированного кавеолина достаточна для увеличения биодоступности NO, что приводит к значительному снижению АД [88].

Усилители транскрипции NOS

AVE3085 и AVE9488 – это две небольшие молекулы, которые были идентифицированы с помощью высокопроизводительного скрининга, способного усиливать транскрипцию eNOS67 *in vitro* и *in vivo*.

Анализ промотора с помощью люциферазного теста показал, что оба соединения связывают даже самый короткий фрагмент промотора eNOS (263 полинуклеотида), но не перекрываются с известными факторами транскрипции eNOS (GATA, Sp1/3-like, Elf-1, YY1, Sp1 или PEA3).

AVE3085 имеет ответственный за связывание с промотором цис-элемент, расположенный в проксимальных 263 парах оснований промоторной области.

В экспериментах на внутренней грудной артерии человека, полученной после процедуры аортокоронарного шунтирования, был показан положительный эффект AVE3085. Он выражался в предотвращении повреждающего действия гомоцистеина на эндотелий при ко-инкубации с AVE3085, при этом наблюдалось повышение уровня мРНК eNOS и увеличение продукции NO [89].

Было также показано, что эти усилители транскрипции NOS увеличивают уровни BH₄ в сосудах, уменьшают образование неоинтимы, вызванной наложением манжеты, и улучшают течение атеросклероза у животных с нокаутом гена ApoE после 12-недельной диеты. AVE9488 способствует ремоделированию кардиомиоцитов в модели инфаркта миокарда, что можно объяснить снижением SMAD-опосредованной передачи сигналов [90].

Блокаторы различных изоформ NOS

Ингибиторы NOS можно классифицировать с разных точек зрения.

Классический энзимологический подход позволяет выделить обратимые (подгруппы: конкурентные, неконкурентные и смешанного типа), необратимые, а также реакционные ингибиторы, действие которых зависит от ферментативной реакции.

Наиболее широко используемая классификация ингибиторов основана на определении сайта их свя-

зывания с ферментом NOS, что позволяет распознать четыре различных класса ингибиторов.

Первый класс, фактически самый большой, взаимодействует с сайтом связывания аргинина. Некоторые соединения, принадлежащие к этому классу, являются ингибиторами на уровне реакций, поскольку для полного ингибирования им требуется активный фермент и НАДФН. Второй класс включает набор соединений, имитирующих кофактор BH₄. Третий класс представлен ингибиторами, непосредственно взаимодействующими с гемом. Некоторые ингибиторы, принадлежащие к этому классу, связываются с гемом мономерной формы фермента и предотвращают образование его активного димера. Четвертый класс охватывает ингибиторы NOS, взаимодействующие с кальмодулином или кофакторами флавина [91].

Также существует классификация, согласно которой ингибиторы NOS можно разделить на две группы: созданные на основе аминокислот (производные и близкие аналоги аргинина) и на основе неаминокислот (широкий спектр соединений, не имеющих аргинин-подобного аминокислотного каркаса). Ингибиторы NOS на основе аргинина вызвали особый интерес, так как эта категория включает большое количество соединений потенциальных для экспериментального и клинического применения. Поскольку эти соединения легко доступны и стабильны в водной среде, они служат прекрасным инструментом для экспериментального ингибирования NOS [91].

Неселективные ингибиторы

Еще до создания кристаллических структур было установлено, что соединения на основе аргинина ингибируют NOS и проявляют нейропротекторные свойства. Например, NG-моно-метил-L-аргинин (2 L-NMMA) и NG-нитро-L-аргинин метиловый эфир (3 L-NAME) защищают нейроны головного мозга при инсульте и болезни Паркинсона. Однако эти ингибиторы также вызывают гипертензивные эффекты, скорее всего, из-за ингибирования eNOS.

Ранние исследования показали, что аналоги субстрата L-аргинина обладают ингибирующими свойствами в отношении трех изоформ NOS. Среди них были охарактеризованы NG-мометил-L-аргинин (L-NMMA) и NG-нитро-L-аргинин (L-NNA) и его предшественник метиловый эфир NG-нитро-L-аргинина (L-NAME), как общие ингибиторы NOS и продолжают широко использоваться в исследованиях, особенно L-NAME [92].

Эндогенные ингибиторы ADMA и L-NMMA

Существует два эндогенных ингибитора NOS. ADMA – это мощный неконкурентный ингибитор NOS, в то время как его родственник L-NMMA – менее мощный, конкурентный ингибитор NOS. Хотя было показано, что ADMA способствует развитию воспалительного синдрома и эндотелиальной дисфункции, наблюдаемым при шоке, возможность

его клинического применения требует дальнейшего изучения [91].

546C88 (N (G) -метил- L-аргинина гидрохлорид)

Соединение 546C88 (N(G)-метил-L-аргинина гидрохлорид) является неселективным ингибитором NOS, который, восстанавливает баланс вазомоторного тонуса у пациентов с септическим шоком, снижая сопутствующую потребность в норадреналине. Он был изучен в клинических испытаниях фазы III в Европе, Северной Америке, Южной Америке, Южной Африке и Австралии. Это исследование было прекращено досрочно из-за повышения риска смерти [91].

L-NAME

Метиловый эфир N-нитро-L-аргинина (L-NAME) и Ng-нитро-L-аргинин (L-NArg) являются синтетическими неселективными ингибиторами NOS, имеющими последствия для злоупотребления психоактивными веществами, поскольку они ослабляют признаки отмены опиоидов у крыс. L-NAME также кажется многообещающим для лечения септического шока путем поддержания адекватного уровня АД. Хроническое введение L-NAME снижает ангиогенез при миграции и инвазивности *in vitro*, указывая на его возможное будущее использование в качестве средства, подавляющего рост опухоли [91].

VAS203

Птерин 4-амино-тетрагидробиоптерин (VAS203) представляет собой аналог BH_4 , который может ингибировать все белки NOS, заменяя кофактор BH_4 . VAS203 показал эффективность при лечении черепно-мозговых травм и использовался в клинических испытаниях фазы II [92].

Селективные ингибиторы iNOS

N-[3-(аминометил) бензил] ацетамидин

N-[3-(аминометил) бензил] ацетамидин является специфическим ингибитором iNOS. Он остается одним из наиболее широко используемых ингибиторов NOS в исследованиях из-за его проницаемости для клеток и тканей. Его избирательность, по-видимому, связана с необратимым эффектом на более быстро реагирующую iNOS, тогда как ингибирование nNOS и eNOS является обратимым. Аналогичный эффект наблюдается в N(5)-(1-иминоэтил)-1-орнитине (1-NIO) [92].

7-нитроиндазол

Одним из первых высокоселективных соединений является 7-нитроиндазол (7-NI). Первоначальные кристаллографические исследования показали, что 7-NI связывается в активном сайте eNOS и изменяет ориентацию Glu активного сайта, в то время как 3-бром-7-NI может связываться как в активном, так и в птериновом сайте [93]. 7-нитроиндазол является специфическим ингибитором nNOS и проявляет противосудорожное действие на моделях судорог у грызунов. Также было показано, что он иногда про-

воцирует судороги у грызунов, вызванных каинитом, никотином и зоманом. Хотя было показано, что все три изоформы могут связывать 7-NI с очень схожей аффинностью, исследования *in vivo* показали ингибирование nNOS без значительного влияния на АД. Это может быть следствием того, что 7-NI может захватываться клетками по-разному и проницаемость эндотелиальных клеток для данного соединения ограничена. Таким образом, хотя 7-NI нельзя точно описать как специфический ингибитор nNOS, он может вести себя как таковой в моделях *in vivo* [92].

Аминогуанидин

Аминогуанидин – селективный ингибитор iNOS, который ослабляет реакцию «трансплантат против хозяина» за счет снижения гематопоезических показателей и сопутствующей восприимчивости к бактериальной инфекции у мышей [94].

L-NIL

Исключительным соединением среди первых разработанных ингибиторов NOS на основе аргинина является L-NIL. Он обладает умеренной селективностью к iNOS, хорошо переносится, а пролекарство на его основе (L-NIL-TA) допускает пероральное введение [95].

GW273629 и GW274150

Соединения GW273629 и GW274150 это серо-замещенные аминокислоты ацетамидина, которые являются специфическими ингибиторами iNOS. Обладая более безопасными профилями токсичности, чем 1400W, GW273629 и GW274150 использовались в клинических испытаниях терапии мигрени (NCT00242866; NCT00319137). Оба соединения оказались неэффективными, возможно из-за особенностей фармакокинетики [91, 92, 95].

eNOS

Как уже было упомянуто выше (см. раздел Эндотелиальная NO-синтаза), eNOS посттрансляционно пальмитилируется и транспортируется в caveолы, где ее активность снижается из-за связывания с caveолином-1. Основываясь на данном механизме, представляется возможным имитировать функции caveолина-1.

На основе данного подхода был разработан кавтрин, препарат, ингибирующий eNOS. Он представляет собой каркасный домен caveолина, сшитый с проницаемым для клеток пептидом пенетратинном, что позволяет кавтрину проходить через плазматическую мембрану. Кавтрин в значительной степени нацелен на eNOS, снижая ее активность и имитируя ингибирующий эффект caveолина-1, при этом, не оказывая влияния на функцию других NOS *in vivo*. Кавтрин снижает повышенную проницаемость микрососудов и блокирует прогрессирование опухоли (показано на модели трансплантированных мышам без тимуса клеток гепатокарциномы HepG2), вос-

становливают плотные контакты в микрососудистых эндотелиальных клетках мозга, обработанных хемокином-2, ингибирует матриксную металлопротеиназу-2/9 и циклооксигеназу-2, что может привести к стабилизации атеросклеротических бляшек и снижению риска внутримозговых кровоизлияний. Кавтрадин также снижает рост глиальных клеток и оказывает протективное действие на гематоэнцефалический барьер при воздействии VEGF-A на мышиную модель рассеянного склероза.

Неизвестным остается факт того, является ли eNOS единственной мишенью кавтрадина. Тем не менее, большинство эффектов по блокированию VEGF и Transforming growth factor (TGF) устранялись, когда эксперименты проводились на мышах с дефицитом eNOS.

Возможно, что кавтрадин может повышать АД при курсовом введении. Однако данных, подтверждающих этот потенциальный эффект, нет. Кроме того, поскольку считается, что CAV1 регулирует многие внутриклеточные сигнальные пути, кавтрадин может оказывать плейотропное действие во многих тканях, особенно в тех, в которых отсутствует eNOS [90].

Другие подходы к ингибированию Ингибирование нижестоящих медиаторов

Метиленовый синий является ингибитором расщепимой гуанилатциклазы (pGC). Это краситель, который можно безопасно использовать у людей при септическом шоке. Он обеспечивает эффективную защиту при шоке, вызванном TNF α , а также при анафилактической гипотензии, не корректируемой другим фармакологическими агентами. Метиленовый синий также может быть полезен при рефрактерных случаях вазоплегии, распространенного осложнения искусственного кровообращения, облегчая нарушение регуляции функции эндотелия, опосредованное воспалением [96]. 1H-[1,2,4]оксадиазоло-[4,3-a]хиноксалин-1-он (ODQ) является селективным ингибитором pGC у крыс, который восстанавливает функцию базальных ганглиев и улучшает моторные симптомы при болезни Паркинсона [94].

Утилизация NO

Исследовательской группой Park J. с сотрудниками был разработан NO-чувствительный гидрогель, продемонстрировавший его быстроту реакции и чувствительность к NO, что представило собой потенциал для прикладного использования в биологии и медицине [96]. Существуют проекты по оценке способности NO-расщепляемых сшивающих агентов (NO-cleavable cross-linker, NOCCL) улавливать NO для лечения ревматоидного артрита (РА). Это первое исследование по возможности применения эндогенного NO непосредственно для лечения РА. При контроле концентрации акриламида в качестве основы полимера и NOCCL в качестве сшивающего агента, был приготовлен сферический наногель путем полимеризации в растворе, чтобы получить нейтрализующий NO-наноразмер-

ный гидрогель (гель NO-Scv) для лечения ревматоидного артрита. Как и ожидалось, гель NO-Scv поглощал NO и снижал уровни провоспалительных цитокинов, продуцируемых активированными макрофагами *in vitro*. Кроме того, после внутрисуставного введения наногеля в каждую лапу мышей с экспериментальным РА, наблюдались терапевтические эффекты, превосходящие отмеченные при применении дексаметазона *in vivo* [98], который ингибирует iNOS-зависимое образование NO, дестабилизируя мРНК iNOS по механизму, требующему синтеза белка *de novo*. Действие дексаметазона на экспрессию iNOS и продукцию NO, а также на распад мРНК iNOS, в некоторой степени, отменяется интерфероном II типа [97].

Терапевтическое применение модуляторов активности различных изоформ синтазы NO

После того, как были идентифицированы различные изоформы NOS, поиски их ингибиторов развивались стремительно. По мере появления все большего числа активных молекул стало очевидно, что селективность в отношении изоформ NOS представляет собой серьезную проблему. Все 3 изоформы NOS человека (nNOS, eNOS и iNOS) имеют почти идентичные структуры активных сайтов, что затрудняет создание селективного ингибитора. Особенно важно избегать ингибирования eNOS из-за его жизненно важной роли в сердечно-сосудистой системе.

Экспериментальные подходы с использованием модуляторов синтеза оксида азота, включая манипуляции с субстратом, донаторами и ингибиторами синтеза NO, будут полезны для установления взаимосвязи между системами NO и клетками сердечно-сосудистой и почечной систем.

Являясь вазодилататором, NO может быть уникальным терапевтическим средством для лечения гипертензии и, как следствие, почечной недостаточности и гипертрофии левого желудочка. Включение модуляторов NO в клиническую практику может быть полезным не только в качестве лечебных средств при определенных заболеваниях, но и для замедления прогрессирования болезней благодаря их влиянию на многие системы организма млекопитающих.

В качестве терапевтического подхода, модуляция активности NOS может быть реализована для лечения эндотелиальной дисфункции, являющейся причиной многих заболеваний. Например, развитие эндотелиальной дисфункции характерно при сахарном диабете: течение данного заболевания характеризуется рядом метаболических нарушений, что в итоге приводит к нарушению работы различных органов и систем, в основном сердечно-сосудистой. Обобщенная характеристика различных NOS представлена в таблице 1.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ферменты группы NOS стали фармакотерапевтическими мишенями сразу после установления их ключевой роли в биосинтезе NO, и интерес к ним возрас-

тает по мере выяснения новых аспектов патогенеза многих острых и хронических заболеваний. В настоящее время практически все заболевания человека в той или иной мере связаны с эндотелием и его дисфункцией, а восстановление адекватного сосудистого гомеостаза невозможно без поддержания кровотока в микроциркуляторном русле на физиологическом уровне. Все чаще терапевтические стратегии многих социально значимых заболеваний (метаболические, сердечно-сосудистые и нейрометаболические) носят эндотелиоцентрический характер и направлены на предупреждение первичных или вторичных сердечно-сосудистых осложнений. Сегодня для терапии

сердечно-сосудистых заболеваний исследуются подходы применения стимуляции факторов ангиогенеза, которые показывают многообещающие результаты на животных, но пока еще не реализованы в клинике. Одной из важных причин этого является сложность и большое количество связанных молекулярных механизмов, регулирующих ишемическое ремоделирование сосудов. Молекула NO может являться таким регулятором, отвечая за согласование и активность сосудистых факторов. Поэтому модуляция активности NOS, таким образом, может служить важным фактором для работы сложной сети, способствуя большей эффективности ангиогенеза.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа поддержана РНФ (проект №20-75-10013).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

ВКЛАД АВТОРОВ

Д.В. Куркин, Е.Е. Абросимова, Д.А. Бакулин, Е.И. Морковин, И.Н. Тюренков – концепция, планирование статьи, обзор литературных источников, сбор материалов, написание и редактирование статьи.
Н.С. Ковалев, М.А. Дубровина, А.В. Борисов, А.В. Стрыгин – сбор материалов, редактирование статьи.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Levine A.B., Punihaole D., Levine T.B. Characterization of the Role of Nitric Oxide and Its Clinical Applications // *Cardiology*. – 2012. – Vol. 122, No.1. – P. 55–68. DOI: 10.1159/000338150.
- Stuart-Smith K. Demystified. Nitric oxide // *Mol. Pathol.* – 2002. – Vol. 55, No.6. – P. 360–366. DOI: 10.1136/mp.55.6.360.
- Fukuto J.M. A recent history of nitroxyl chemistry, pharmacology and therapeutic potential // *Br. J. Pharmacol.* – 2019. – Vol. 176, No.2. – P. 135–146. DOI: 10.1111/bph.14384.
- Kourosh-Armani M., Hosseini N., Mohsenzadegan M., Komaki A., Joghataei M.T. Neurophysiologic implications of neuronal nitric oxide synthase // *Rev. Neurosci.* – 2020. – Vol. 31, No. 6. – P. 617–636. DOI: 10.1515/revneuro-2019-0111.
- Hardingham N., Dachtler J., Fox K. The role of nitric oxide in pre-synaptic plasticity and homeostasis // *Frontiers in cellular neuroscience*. – 2013. – Vol. 7. – P. 190. DOI: 10.3389/fncel.2013.00190.
- Dubey H., Gulati K., Ray A. Alzheimer's Disease: A Contextual Link with Nitric Oxide Synthase. *Curr. Mol. Med.* – 2020. – Vol. 20, No. 7. – P. 505–515. DOI: 10.2174/1566524019666191129103117.
- Liskova S. The organ-specific nitric oxide synthase activity in the interaction with sympathetic nerve activity: a hypothesis // *Physiol. Res.* – 2021. – Vol. 70, No. 2. – P. 169–175. DOI: 10.33549/physiolres.934676.
- Fender A.C., Dobrev D. Nitric oxide as a fragile switch between cardioprotection and cardiac injury // *Int. J. Cardiol.* – 2021. – Vol. 343. – P. 102–103. DOI: 10.1016/j.ijcard.2021.09.001.
- Radziwon-Balicka A., Lesyk G., Back V., Fong T., Loredon-Calderon E.L., Dong B., El-Sikhry H., El-Sherbeni A.A., El-Kadi A., Ogg S., Siraki A., Seubert J.M., Santos-Martinez M.J., Radomski M.W., Velazquez-Martinez C.A., Winship I.R., Jurasz P. Differential eNOS-signalling by platelet subpopulations regulates adhesion and aggregation // *Cardiovasc. Res.* – 2017. – Vol. 113, No.14. – P. 1719–1731. DOI: 10.1093/cvr/cvx179.
- Infante T., Costa D., Napoli C. Novel Insights Regarding Nitric Oxide and Cardiovascular Diseases // *Angiology*. – 2021. – Vol. 72, No.5. – P. 411–425. DOI: 10.1177/0003319720979243.
- Idrizaj E., Traini C., Vannucchi M.G., Baccari M.C. Nitric oxide: from gastric motility to gastric dysmotility // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – Vol. 22, No.18. – Art. No. 9990. DOI: 10.3390/ijms22189990.
- Hong P.P., Zhu X.X., Yuan W.J., Niu G.J., Wang J.X. Nitric oxide synthase regulates gut microbiota homeostasis by ERK-NF- κ B pathway in shrimp // *Front. Immunol.* – 2021. – Vol. 12. – Art. No. 778098. DOI: 10.3389/fimmu.2021.778098.
- Sibisi N.C., Snyman C., Myburgh K.H., Niesler C.U. Evaluating the role of nitric oxide in myogenesis in vitro // *Biochimie*. – 2021. – Vol. S0300-9084, No.21. – P. 00269–8. DOI: 10.1016/j.biochi.2021.11.006.
- Balke J.E., Zhang L., Percival J.M. Neuronal nitric oxide synthase (nNOS) splice variant function: Insights into nitric oxide signaling from skeletal muscle // *Nitric Oxide*. – 2019. – Vol. 82. – P. 35–47. DOI: 10.1016/j.niox.2018.11.004.
- Baig M.S., Zaichick S.V., Mao M., de Abreu A.L., Bakhshi F.R., Hart P.C., Saqib U., Deng J., Chatterjee S., Block M.L., Vogel S.M., Malik A.B., Consolaro M.E.L., Christman J.W., Minshall R.D., Gantner B.N., Bonini M.G. NOS1-derived nitric oxide promotes NF- κ B transcriptional activity through inhibition of suppressor of cytokine signaling-1 // *J. Exp. Med.* – 2015. – Vol. 212, No.10. – P. 1725–1738. DOI: 10.1084/jem.20140654.
- Hotchkiss R.S., Moldawer L.L., Opal S.M., Reinhart K., Turnbull I.R., Vincent J.L. Sepsis and septic shock // *Nat. Rev. Dis. Primers*. – 2016. – Vol. 2, No.1. – Art. No. 16045. DOI: 10.1038/nrdp.2016.45.
- Luiking Y.C., Engelen M.P., Deutz N.E. Regulation of nitric oxide production in health and disease // *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*. – 2010. – Vol. 13, No.1. – P. 97–104. DOI: 10.1097/MCO.0b013e3283232f99d.
- Bredt D.S., Snyder S.H. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1990. – Vol. 87, No.2. – P. 682–685. DOI: 10.1073/pnas.87.2.682.

19. Salvemini D., Kim S.F., Mollace V. Reciprocal regulation of the nitric oxide and cyclooxygenase pathway in pathophysiology: relevance and clinical implications // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* – 2013. – Vol. 304, No.7. – P. 473–487. DOI:10.1152/ajpregu.00355.2012.
20. Palmieri E.M., McGinity C., Wink D.A., McVicar D.W. Nitric Oxide in Macrophage Immunometabolism: Hiding in Plain Sight // *Metabolites*. – 2020. – Vol. 10, No.11. – Art. No.429. DOI:10.3390/metabo10110429.
21. Förstermann U., Sessa W.C. Nitric oxide synthases: regulation and function // *Eur. Heart J.* – 2012. – Vol. 33, No.7. – P. 829–837. DOI: 10.1093/eurheartj/ehs304.
22. Förstermann U., Pollock J.S., Schmidt H.H., Heller M., Murad F. Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1991. – Vol. 88, No. 5. – P. 1788–1792. DOI: 10.1073/pnas.88.5.1788.
23. Pollock J.S., Förstermann U., Mitchell J.A., Warner T.D., Schmidt H.H., Nakane M., Murad F. Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1991. – Vol. 88, No.23. – P. 10480–10484. DOI: 10.1073/pnas.88.23.10480.
24. Balligand J.L., Kelly R.A., Marsden P.A., Smith T.W., Michel T. Control of cardiac muscle cell function by an endogenous nitric oxide signaling system // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1993. – Vol. 90, No.1. – P. 347–351. DOI: 10.1073/pnas.90.1.347.
25. Sase K., Michel T. Expression of constitutive endothelial nitric oxide synthase in human blood platelets // *Life Sci.* – 1995. – Vol. 57, No.22. – P. 2049–2055. DOI: 10.1016/0024-3205(95)02191-K.
26. Dinerman J.L., Dawson T.M., Schell M.J., Snowman A., Snyder S.H. Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic plasticity // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1994. – Vol. 91, No.10. – P. 4214–4218. DOI: 10.1073/pnas.91.10.4214.
27. Marsden P.A., Heng H.H., Scherer S.W., Stewart R.J., Hall A.V., Shi X.M., Tsui L.C., Schappert K.T. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene // *J. Biol. Chem.* – 1993. – Vol. 15, No.23. – P. 17478–17488.
28. Oliveira-Paula G.H., Lacchini R., Tanus-Santos J.E. Endothelial nitric oxide synthase: From biochemistry and gene structure to clinical implications of NOS3 polymorphisms // *Gene.* – 2016. – Vol. 575, No.2 (Pt 3). – P. 584–599. DOI: 10.1016/j.gene.2015.09.061.
29. Qian J., Fulton D. Post-translational regulation of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelium // *Front. Physiol.* – 2013. – Vol. 13, No.4. – P. 347. DOI: 10.3389/fphys.2013.00347.
30. Hall A.V., Antoniou H., Wang Y., Cheung A.H., Arbus A.M., Olson S.L., Lu W.C., Kau C.L., Marsden P.A. Structural organization of the human neuronal nitric oxide synthase gene (NOS1) // *J. Biol. Chem.* – 1994. – Vol. 269, No.52. – P. 33082–33090.
31. Eliasson M.J., Blackshaw S., Schell M.J., Snyder S.H. Neuronal nitric oxide synthase alternatively spliced forms: prominent functional localizations in the brain // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1997. – Vol. 94, No.7. – P. 3396–3401. DOI: 10.1073/pnas.94.7.3396.
32. Sharma N.M., Patel K.P. Post-translational regulation of neuronal nitric oxide synthase: implications for sympathoexcitatory states // *Expert. Opin. Ther. Targets.* – 2017. – Vol. 21, No.1. – P. 11–22. DOI: 10.1080/14728222.2017.1265505.
33. Zhang Y.H., Jin C.Z., Jang J.H., Wang Y. Molecular mechanisms of neuronal nitric oxide synthase in cardiac function and pathophysiology // *J. Physiol.* – 2014. – Vol. 592, No.15. – P. 3189–3200. DOI: 10.1113/jphysiol.2013.270306.
34. Pautz A., Art J., Hahn S., Nowag S., Voss C., Kleinert H. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase // *Nitric Oxide.* – 2010. – Vol. 23, No.2. – P. 75–93. DOI: 10.1016/j.niox.2010.04.007.
35. Förstermann U., Closs E.I., Pollock J.S., Nakane M., Schwarz P., Gath I., Kleinert H. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions // *Hypertension.* – 1994. – Vol. 23, No.6 (Pt. 2). – P. 1121–1131. DOI: 10.1161/01.HYP.23.6.1121.
36. Tejero J., Shiva S., Gladwin M.T. Sources of Vascular Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species and Their Regulation // *Physiol. Rev.* – 2019. – Vol. 99, No.1. – P. 311–379. DOI: 10.1152/physrev.00036.2017.
37. Cinelli M.A., Do H.T., Miley G.P., Silverman R.B. Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition // *Med. Res. Rev.* – 2020. – Vol. 40, No.1. – P. 158–189. DOI: 10.1002/med.21599.
38. Giulivi C., Poderoso J.J., Boveris A. Production of nitric oxide by mitochondria // *J. Biol. Chem.* – 1998. – Vol. 273, No.18. – P. 11038–11043. DOI: 10.1074/jbc.273.18.11038.
39. Tengan C.H., Rodrigues G.S., Godinho R.O. Nitric oxide in skeletal muscle: role on mitochondrial biogenesis and function // *Int. J. Mol. Sci.* – 2012. – Vol. 13, No.12. – P. 17160–17184. DOI: 10.3390/ijms131217160.
40. Figueira T.R., Barros M.H., Camargo A.A., Castilho R.F., Ferreira J.C., Kowaltowski A.J., Sluse F.E., Souza-Pinto N.C., Vercesi A.E. Mitochondria as a source of reactive oxygen and nitrogen species: from molecular mechanisms to human health // *Antioxid. Redox. Signal.* – 2013. – Vol. 18, No.16. – P. 2029–2074. DOI: 10.1089/ars.2012.4729.
41. Tatoyan A., Giulivi C. Purification and characterization of a nitric-oxide synthase from rat liver mitochondria // *J. Biol. Chem.* – 1998. – Vol. 273, No.18. – P. 11044–11048. DOI: 10.1074/jbc.273.18.11044.
42. Bates T.E., Loesch A., Burnstock G., Clark J.B. Immunocytochemical evidence for a mitochondrially located nitric oxide synthase in brain and liver // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1995. – Vol. 213, No.3. – P. 896–900. DOI: 10.1006/bbrc.1995.2213.
43. Gao S., Chen J., Brodsky S.V., Huang H., Adler S., Lee J.H., Dhadwal N., Cohen-Gould L., Gross S.S., Goligorsky M.S. Docking of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) to the mitochondrial outer membrane: a pentabasic amino acid sequence in the autoinhibitory domain of eNOS targets a proteinase K-cleavable peptide on the cytoplasmic face of mitochondria // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279, No.16. – P. 15968–15974. DOI: 10.1074/jbc.M308504200.
44. Elfering S.L., Sarkela T.M., Giulivi C. Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277, No.41. – P. 38079–38086. DOI: 10.1074/jbc.M205256200.
45. Kanai A.J., Pearce L.L., Clemens P.R., Birder L.A., VanBibber M.M., Choi S.Y., de Groat W.C., Peterson J. Identification of a neuronal nitric oxide synthase in isolated cardiac mitochondria using electrochemical detection // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2001. – Vol. 98, No.24. – P. 14126–14131. DOI: 10.1073/pnas.241380298.
46. Lacza Z., Snipes J.A., Zhang J., Horváth E.M., Figueroa J.P., Szabó C., Busija D.W. Mitochondrial nitric oxide synthase is not eNOS, nNOS or iNOS // *Free Radic. Biol. Med.* – 2003. – Vol. 35, No.10. – P. 1217–1228. DOI: 10.1016/s0891-5849(03)00510-0.
47. Venkatakrishnan P., Nakayasu E.S., Almeida I.C., Miller R.T. Absence of nitric-oxide synthase in sequentially purified rat liver mitochondria // *J. Biol. Chem.* – 2009. – Vol. 284, No.30. – P. 19843–19855. DOI: 10.1074/jbc.M109.003301.
48. Parihar M.S., Nazarewicz R.R., Kincaid E., Bringold U.,

- Ghafoorifar P. Association of mitochondrial nitric oxide synthase activity with respiratory chain complex I // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2008. – Vol. 366, No.1. – P. 23–28. DOI: 10.1016/j.bbrc.2007.11.056.
49. Bombicino S.S., Iglesias D.E., Zaobornyj T., Boveris A., Valdez L.B. Mitochondrial nitric oxide production supported by reverse electron transfer // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2016. – Vol. 607. – P. 8–19. DOI: 10.1016/j.abb.2016.08.010.
 50. Brookes P.S. Mitochondrial nitric oxide synthase // *Mitochondrion*. – 2004. – Vol. 3, No.4. – P. 187–204. DOI: 10.1016/j.mito.2003.10.001.
 51. Giulivi C. Characterization and function of mitochondrial nitric-oxide synthase // *Free Radic. Biol. Med.* – 2003. – Vol. 34, No.4. – P. 397–408. DOI: 10.1016/s0891-5849(02)01298-4.
 52. Tengan C.H., Moraes C.T. NO control of mitochondrial function in normal and transformed cells // *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* – 2017. – Vol. 1858, No.8. – P. 573–581. DOI: 10.1016/j.bbabi.2017.02.009.
 53. Shah R.C., Sanker S., Wood K.C., Durgin B.G., Straub A.C. Redox regulation of soluble guanylyl cyclase // *Nitric Oxide*. – 2018. – Vol. 76. – P. 97–104. DOI: 10.1016/j.niox.2018.03.013.
 54. Sharin V.G., Mujoo K., Kots A.Y., Martin E., Murad F., Sharina I.G. Nitric oxide receptor soluble guanylyl cyclase undergoes splicing regulation in differentiating human embryonic cells // *Stem. Cells Dev.* – 2011. – Vol. 20, No.7. – P. 1287–1293. DOI: 10.1089/scd.2010.0411.
 55. Derbyshire E.R., Marletta M.A. Structure and regulation of soluble guanylate cyclase // *Annu. Rev. Biochem.* – 2012. – Vol. 81. – P. 533–59. DOI: 10.1146/annurev-biochem-050410-100030.
 56. Montfort W.R., Wales J.A., Weichsel A. Structure and Activation of Soluble Guanylyl Cyclase, the Nitric Oxide Sensor // *Antioxid. Redox Signal.* – 2017. – Vol. 26, No.3. – P. 107–121. DOI: 10.1089/ars.2016.6693.
 57. Förstermann U., Xia N., Li H. Roles of Vascular Oxidative Stress and Nitric Oxide in the Pathogenesis of Atherosclerosis // *Circ. Res.* – 2017. – Vol. 120, No.4. – P. 713–735. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309326.
 58. Li H., Förstermann U. Uncoupling of endothelial NO synthase in atherosclerosis and vascular disease // *Curr. Opin. Pharmacol.* – 2013. – Vol. 13, No.2. – P. 161–167. DOI: 10.1016/j.coph.2013.01.006.
 59. Roe N.D., Ren J. Nitric oxide synthase uncoupling: a therapeutic target in cardiovascular diseases // *Vascul. Pharmacol.* – 2012. – Vol. 57, No.5–6. – P. 168–72. DOI: 10.1016/j.vph.2012.02.004.
 60. Alkaitis M.S., Crabtree M.J. Recoupling the cardiac nitric oxide synthases: tetrahydrobiopterin synthesis and recycling // *Curr. Heart Fail. Rep.* – 2012. – Vol. 9, No.3. – P. 200–210. DOI: 10.1007/s11897-012-0097-5.
 61. Crabtree M.J., Brixey R., Batchelor H., Hale A.B., Channon K.M. Integrated redox sensor and effector functions for tetrahydrobiopterin- and glutathionylation-dependent endothelial nitric-oxide synthase uncoupling // *J. Biol. Chem.* – 2013. – Vol. 288, No.1. – P. 561–569. DOI: 10.1074/jbc.M112.415992.
 62. Chen C.A., Wang T.Y., Varadharaj S., Reyes L.A., Hemann C., Talukder M.A., Chen Y.R., Druhan L.J., Zweier J.L. S-glutathionylation uncouples eNOS and regulates its cellular and vascular function // *Nature*. – 2010. – Vol. 468, No.7327. – P. 1115–1158. DOI: 10.1038/nature09599.
 63. Chen D.D., Chen L.Y., Xie J.B., Shu C., Yang T., Zhou S., Yuan H., Chen A.F. Tetrahydrobiopterin regulation of eNOS redox function // *Curr. Pharmaceutical Des.* – 2014. – Vol. 20, No.22. – P. 3554–3562. DOI: 10.2174/13816128113196660747.
 64. Crabtree M.J., Tatham A.L., Hale A.B., Alp N.J., Channon K.M. Critical role for tetrahydrobiopterin recycling by dihydrofolate reductase in regulation of endothelial nitric-oxide synthase coupling: relative importance of the de novo biopterin synthesis versus salvage pathways // *J. Biol. Chem.* – 2009. – Vol. 284, No.41. – P. 28128–28136. DOI: 10.1074/jbc.M109.041483.
 65. Kietadisorn R., Kietselaer B.L., Schmidt H.H., Moens A.L. Role of tetrahydrobiopterin (BH₄) in hyperhomocysteinemia-induced endothelial dysfunction: new indication for this orphan-drug? // *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metabol.* – 2011. – Vol. 300, No.6. – E1176. DOI: 10.1152/ajpendo.00084.2011.
 66. Dikalova A., Aschner J.L., Kaplowitz M.R., Summar M., Fike C.D. Tetrahydrobiopterin oral therapy recouples eNOS and ameliorates chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension in newborn pigs // *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* – 2016. – Vol. 311, No.4. – P. 743–753. DOI: 10.1152/ajplung.00238.2016.
 67. Suckling C.J., Gibson, C.L., Huggan, J.K., Morthala, R.R., Clarke B., Kununthur S., Wadsworth R.M., Daff S., Papale D. 6-Acetyl-7, 7-dimethyl-5, 6, 7, 8-tetrahydropterin is an activator of nitric oxide synthases // *Bioorg. Med. Chem. Letters*. – 2008. – Vol. 18, No.5. – P. 1563–1566. DOI: 10.1016/j.bmcl.2008.01.079.
 68. An H., Wei R., Ke J., Yang J., Liu Y., Wang X., Wang G., Hong T. Metformin attenuates fluctuating glucose-induced endothelial dysfunction through enhancing GTPCH1-mediated eNOS recoupling and inhibiting NADPH oxidase // *J. Diabetes Complications*. – 2016. – Vol. 30, No.6. – P. 1017–1024. DOI: 10.1016/j.jdiacomp.2016.04.018.
 69. Caldwell R.B., Toque H.A., Narayanan S.P., Caldwell R.W. Arginase: an old enzyme with new tricks // *Trends Pharmacol. Sci.* – 2015. – Vol. 36, No.6. – P. 395–405. DOI: 10.1016/j.tips.2015.03.006.
 70. Caldwell R.W., Rodriguez P.C., Toque H.A., Narayanan S.P., Caldwell R.B. Arginase: a multifaceted enzyme important in health and disease // *Physiol. Rev.* – 2018. – Vol. 98, No.2. – P. 641–665. DOI: 10.1152/physrev.00037.2016.
 71. Kim J.H., Bugaj L.J., Oh Y.J., Bivalacqua T.J., Ryoo S., Soucy K.G., Santhanam L., Webb A., Camara A., Sikka G., Nyhan D., Shoukas A.A., Ilies M., Christianson D.W., Champion H.C., Berkowitz D.E. Arginase inhibition restores NOS coupling and reverses endothelial dysfunction and vascular stiffness in old rats // *J. Appl. Physiol.* – 2009. – Vol. 107, No.4. – P. 1249–1257. DOI: 10.1152/japplphysiol.91393.2008.
 72. El-Bassossy H.M., El-Fawal R., Fahmy A., Watson M.L. Arginase inhibition alleviates hypertension in the metabolic syndrome // *Br. J. Pharmacol.* – 2013. – Vol. 169, No.3. – P. 693–703. DOI: 10.1111/bph.12144.
 73. Polis B., Srikanth K.D., Gurevich V., Gil-Henn H., Samson A.O. L-Norvaline, a new therapeutic agent against Alzheimer's disease // *Neural Regen. Res.* – 2019. – Vol. 14, No.9. – P. 1562. DOI: 10.4103/1673-5374.255980.
 74. Rikitake Y., Liao J.K. Rho GTPases, statins, and nitric oxide // *Circul. Res.* – 2005. – Vol. 97, No.12. – P. 1232–1235. DOI: 10.1161/01.RES.0000196564.18314.23.
 75. Rohilla A., Rohilla S., Kumar A., Khan M.U., Deep A. Pleiotropic effects of statins: A boulevard to cardioprotection // *Arab. J. Chem.* – 2016. – Vol. 9. – P. S21–S27. DOI: 10.1016/j.arabjc.2011.06.025.
 76. Gorabi A.M., Kiaie N., Hajighasemi S., Banach M., Penson P.E., Jamialahmadi T., Sahebkar A. Statin-induced nitric oxide signaling: mechanisms and therapeutic implications // *J. Clin. Med.* – 2019. – Vol. 8, No.12. – Art. No. 2051. DOI: 10.3390/jcm8122051.
 77. Margaritis M., Channon K.M., Antoniadou C. Statins as regulators of redox state in the vascular endothelium: beyond lipid lowering // *Antioxid. Redox. Signal.* – 2014. – Vol. 20, No.8. – P. 1198–1215. DOI: 10.1089/ars.2013.5430.
 78. Antoniadou C., Shirodaria C., Leeson P., Antonopoulos

- A., Warrick N., Van-Assche T., Cunnington C., Tousoulis D., Pillai R., Ratnatunga C., Stefanadis C., Channon K.M. Association of plasma asymmetrical dimethylarginine (ADMA) with elevated vascular superoxide production and endothelial nitric oxide synthase uncoupling: implications for endothelial function in human atherosclerosis // *Eur. Heart J.* – 2009. – Vol. 30, No.9. – P. 1142–1150. DOI: 10.1093/eurheartj/ehp061.
79. Serban C., Sahebkar A., Ursoniu S., Mikhailidis D.P., Rizzo M., Lip G.Y., Kees Hovingh G., Kastelein J.J., Kalinowski L., Rysz J., Banach M.A. A systematic review and meta-analysis of the effect of statins on plasma asymmetric dimethylarginine concentrations // *Sci. Rep.* – 2015. – Vol. 5, No.1. – Art. No. 9902. DOI: 10.1038/srep09902.
 80. Xia N., Förstermann U., Li H. Resveratrol and endothelial nitric oxide // *Molecules.* – 2014. – Vol. 19, No.10. – P. 16102–16121. DOI: 10.3390/molecules191016102.
 81. Suschek C., Kolb H., Kolb-Bachofen V. Dobesilate enhances endothelial nitric oxide synthase-activity in macro- and microvascular endothelial cells // *Br. J. Pharmacol.* – 1997. – Vol. 122, No.7. – P. 1502–1508. DOI: 10.1038/sj.bjp.0701512.
 82. Carrizzo A., Lenzi P., Procaccini C., Damato A., Biagioni F., Ambrosio M., Amodio G., Remondelli P., Del Giudice C., Izzo R., Malovini A., Formisano L., Gigantino V., Madonna M., Puca A.A., Trimarco B., Matarese G., Fornai F., Vecchione C. Pentraxin 3 Induces Vascular Endothelial Dysfunction Through a P-selectin/Matrix Metalloproteinase-1 Pathway // *Circulation.* – 2015. – Vol. 131, No.17. – P. 1495–1505. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.014822.
 83. Leung W.K., Gao L., Siu P.M., Lai C.W. Diabetic nephropathy and endothelial dysfunction: Current and future therapies, and emerging of vascular imaging for preclinical renal-kinetic study // *Life Sci.* – 2016. – Vol. 166. – P. 121–130. DOI: 10.1016/j.lfs.2016.10.015.
 84. Zhou Y., Qi C., Li S., Shao X., Ni Z. Investigation of the Mechanism Underlying Calcium Dobesilate-Mediated Improvement of Endothelial Dysfunction and Inflammation Caused by High Glucose // *Mediators Inflamm.* – 2019. – Vol. 2019. – Art. ID: 9893682. DOI: 10.1155/2019/9893682.
 85. Sison K., Eremina V., Baelde H., Min W., Hirashima M., Fantus I.G., Quaggin S.E. Glomerular structure and function require paracrine, not autocrine, VEGF-VEGFR-2 signaling // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2010. – Vol. 21, No.10. – P. 1691–1701. DOI: 10.1681/ASN.2010030295.
 86. Baelde H.J., Eikmans M., Lappin D.W., Doran P.P., Hohenadel D., Brinkkoetter P.T., van der Woude F.J., Waldehrr R., Rabelink T.J., de Heer E., Bruijn J.A. Reduction of VEGF-A and CTGF expression in diabetic nephropathy is associated with podocyte loss // *Kidney Int.* – 2007. – Vol. 71, No.7. – P. 637–645. DOI: 10.1038/sj.ki.5002101.
 87. Haller H., Ji L., Stahl K., Bertram A., Menne J. Molecular Mechanisms and Treatment Strategies in Diabetic Nephropathy: New Avenues for Calcium Dobesilate-Free Radical Scavenger and Growth Factor Inhibition // *Biomed. Res. Int.* – 2017. – Vol. 2017. – Art. ID: 1909258. DOI: 10.1155/2017/1909258.
 88. Kraehling J.R., Sessa W.C. Contemporary Approaches to Modulating the Nitric Oxide-cGMP Pathway in Cardiovascular Disease. *Circ Res.* – 2017. – Vol. 120, No.7. – P. 1174–1182. DOI: 10.1161/circresaha.117.303776.
 89. Hou H.T., Wang J., Zhang X., Wang Z.Q., Chen T.N., Zhang J.L., Yang Q., He G.W. Endothelial nitric oxide synthase enhancer AVE3085 reverses endothelial dysfunction induced by homocysteine in human internal mammary arteries // *Nitric Oxide.* – 2018. – Vol. 81. – P. 21–27. DOI: 10.1016/j.niox.2018.10.001.
 90. White A.R., Ryoo S., Bugaj L., Attarzadeh D.O., Thiagarajan S., Chen K., Attwater S., Abbot B., Li D., Champion H.C., Shoukas A.A., Nyhan D., Hare J.M., Berkowitz D.E., Tuday E.C. Early changes in vasoreactivity after simulated microgravity are due to an upregulation of the endothelium-dependent nitric oxide/cGMP pathway // *Eur. J. Appl. Physiol.* – 2010. – Vol. 110, No.2. – P. 395–404. DOI: 10.1007/s00421-010-1514-7.
 91. Alderton W.K., Cooper C.E., Knowles R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition // *Biochem. J.* – 2001. – Vol. 357, No. 3. – P. 593–615 DOI: 10.1042/0264-6021:3570593.
 92. Schulman I.H., Hare J.M. Regulation of cardiovascular cellular processes by S-nitrosylation // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2012. – Vol. 1820, No.6. – P. 752–762. DOI: 10.1016/j.bbagen.2011.04.002.
 93. Poulos T.L., Li H. Nitric oxide synthase and structure-based inhibitor design // *Nitric Oxide.* – 2017. – Vol. 63. – P. 68–77. DOI: 10.1016/j.niox.2016.11.004.
 94. Wong V.W., Lerner E. Nitric oxide inhibition strategies // *Future Sci. OA.* – 2015. – Vol. 1, No.1. – Art. ID: FSO35. DOI: 10.4155/fso.15.35.
 95. Vítěček J., Lojek A., Valacchi G., Kubala L. Arginine-based inhibitors of nitric oxide synthase: therapeutic potential and challenges // *Mediators Inflamm.* – 2012. – Vol. 2012. – Art. No. 318087. DOI: 10.1155/2012/318087.
 96. Park J., Pramanick S., Park D., Yeo J., Lee J., Lee H., Kim W.J. Therapeutic-Gas-Responsive Hydrogel // *Adv. Mater.* – 2017. – Vol. 29, No.44. – Art. No. 1702859. DOI: 10.1002/adma.201702859.
 97. Korhonen R., Lahti A., Hämäläinen M., Kankaanranta H., Moilanen E. Dexamethasone inhibits inducible nitric-oxide synthase expression and nitric oxide production by destabilizing mRNA in lipopolysaccharide-treated macrophages // *Mol. Pharmacol.* – 2002. – Vol. 62, No.3. – P. 698–704. DOI: 10.1124/mol.62.3.698.
 98. Yeo J., Lee Y.M., Lee J., Park D., Kim K., Kim J., Park J., Kim W.J. Nitric Oxide-Scavenging Nanogel for Treating Rheumatoid Arthritis // *Nano Lett.* – 2019. – Vol. 19, No.10. – P. 6716–6724. DOI: 10.1021/acs.nanolett.9b00496.
 99. Putzke J., Seidel B., Huang P.L., Wolf G. Differential expression of alternatively spliced isoforms of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) and N-methyl-D-aspartate receptors (NMDAR) in knockout mice deficient in nNOS alpha (nNOS alpha(Delta/Delta) mice) // *Brain Res. Mol. Brain Res.* – 2000. – Vol.85, No.1–2. – P. 13–23. DOI: 10.1016/S0169-328X(00)00220-5.
 100. Frandsen U., Lopez-Figueroa M., Hellsten Y. Localization of nitric oxide synthase in human skeletal muscle // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1996. – Vol. 227, No.1. – P. 88–93. DOI: 10.1006/bbrc.1996.1472.
 101. El-Yazbi A.F., Cho W.J., Cena J., Schulz R., Daniel E.E. Smooth muscle NOS, colocalized with caveolin-1, modulates contraction in mouse small intestine // *J. Cell. Mol. Med.* – 2008. – Vol. 12, No.4. – P. 1404–1415. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2008.00335.x.
 102. Saluja R., Saini R., Mitra K., Bajpai V.K., Dikshit M. Ultrastructural immunogold localization of nitric oxide synthase isoforms in rat and human eosinophils // *Cell Tissue Res.* – 2010. – Vol. 340, No. 2. – P. 381–388. DOI: 10.1007/s00441-010-0947-y.
 103. Saini R., Singh S. Inducible nitric oxide synthase: An asset to neutrophils // *J. Leukoc. Biol.* – 2019. – Vol. 105, No.1. – P. 49–61. DOI: 10.1002/JLB.4RU0418-161R.
 104. Feron O.C., Moniotte S., Desager J.P., Balligand J.L. Hypercholesterolemia decreases nitric oxide production by promoting the interaction of caveolin and endothelial nitric oxide synthase // *J. Clin. Invest.* – 1999. – Vol. 103, No.6. – P. 897–905. DOI: 10.1172/JCI4829.
 105. Garthwaite J. Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission // *Eur. J. Neurosci.* – 2008. – Vol. 27, No.11. – P. 2783–2802. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2008.06285.x.

106. Lajoix A.D., Reggio H., Chardes T., Péraldi-Roux S., Tribillac F., Roye M., Dietz S., Broca C., Manteghetti M., Ribes G., Wollheim C., Gross R. A neuronal isoform of nitric oxide synthase expressed in pancreatic β -cells controls insulin secretion // *Diabetes*. – 2001. – Vol. 50, No.6. – P. 1311–1323. DOI: 10.2337/diabetes.50.6.1311
107. Schwarz P.M., Kleinert H., Förstermann U. Potential functional significance of brain-type and muscle-type nitric oxide synthase I expressed in adventitia and media of rat aorta // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 1999. – Vol. 19, No.11. – P. 2584–2590. DOI: 10.1161/01.ATV.19.11.2584.
108. Kleinert H., Pautz A., Linker K., Schwarz P.M. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase // *Eur. J. Pharmacol.* – 2004. – Vol. 500, No.1–3. – P. 255–266. DOI: 10.1016/j.ejphar.2004.07.030.
109. Förstermann U., Schmidt H.H., Pollock J.S., Sheng H., Mitchell J.A., Warner T.D., Nakane M., Murad F. Isoforms of nitric oxide synthase characterization and purification from different cell types // *Biochem. Pharmacol.* – 1991. – Vol. 42, No.10. – P. 1849–1857. DOI: 10.1016/0006-2952(91)90581-o.
110. Dombernowsky NW, Ölmestig JNE, Witting N, Kruuse C. Role of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) in Duchenne and Becker muscular dystrophies – Still a possible treatment modality? // *Neuromuscul. Disord.* – 2018. – Vol. 28, No. 11. – P. 914–926. DOI: 10.1016/j.nmd.2018.09.001.
111. Mörlin B., Andersson E., Byström B., Hammarström M. Nitric oxide induces endometrial secretion at implantation time // *Acta Obstet Gynecol Scand.* – 2005. – Vol. 84, No.11. – P. 1029–1034. DOI: 10.1111/j.0001-6349.2005.00804.x.
112. Lu D., Fu Y., Lopez-Ruiz A., Zhang R., Juncos R., Liu H., Manning R.D.Jr., Juncos L.A., Liu R. Salt-sensitive splice variant of nNOS expressed in the macula densa cells // *Am. J. Physiol.-Ren. Physiol.* – 2010. – Vol. 298, No. 6. – P. 1465–1471. DOI: 10.1152/ajprenal.00650.2009.
113. Förstermann U., Li H. Therapeutic effect of enhancing endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression and preventing eNOS uncoupling // *Br. J. Pharmacol.* – 2011. – Vol. 164, No.2. – P. 213–223. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2010.01196.x.
114. Moncada S. Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine // *J. Royal Soc. Med.* – 1999. – Vol. 92, No. 4. – P. 164–169. DOI: 10.1177/014107689909200402.
115. Tojo A., Onozato M.L., Fujita T. Role of macula densa neuronal nitric oxide synthase in renal diseases // *Med. Mol. Morph.* – 2006. – Vol. 39, No.1. – P. 2–7. DOI: 10.1007/s00795-006-0310-2.
116. Takahashi T. Pathophysiological significance of neuronal nitric oxide synthase in the gastrointestinal tract // *J. Gastroenterol.* – 2003. – Vol. 38, No.5. – P. 421–430. DOI: 10.1007/s00535-003-1094-y.
117. Xu L., Xie K., Fidler I.J. Therapy of human ovarian cancer by transfection with the murine interferon β gene: role of macrophage-inducible nitric oxide synthase // *Human Gene Ther.* – 1998. – Vol. 9, No.18. – P. 2699–2708. DOI: 10.1089/hum.1998.9.18-2699.
118. Kröncke K.D., Fehsel K., Kolb-Bachofen V. Inducible nitric oxide synthase and its product nitric oxide, a small molecule with complex biological activities // *Biol. Chem. Hoppe Seyler.* – 1995. – Vol. 376, No.6. – P. 327–343. DOI: 10.1515/bchm3.1995.376.6.327.
119. Moncada S., Higgs E.A. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance // *Eur. J. Clin. Invest.* – 1991. – Vol. 21, No.4. – P. 361–374. DOI: 10.1111/j.1365-2362.1991.tb01383.x.
120. Langrehr J.M., Hoffman R.A., Lancaster J.R. (Jr.), Simmons R.L. Nitric oxide—a new endogenous immunomodulator // *Transplantation.* – 1993. – Vol. 55, No.6. – P. 1205–1212. DOI: 10.1097/00007890-199306000-00001.
121. Aicher A., Heeschen C., Mildner-Rihm C., Urbich C., Ihling C., Technau-Ihling K., Zeiher A.M., Dimmeler S. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells // *Nat. Med.* – 2003. – Vol. 9, No.11. – P. 1370–1376. DOI: 10.1038/nm948.
122. Zhou Q.G., Zhu X.H., Nemes A.D., Zhu D.Y. Neuronal nitric oxide synthase and affective disorders // *IBRO reports.* – 2018. – Vol. 5. – P. 116–132. DOI: 10.1016/j.ibror.2018.11.004.

АВТОРЫ

Куркин Денис Владимирович – доктор фармацевтических наук, доцент, профессор кафедры клинической фармакологии и интенсивной терапии; первый заместитель директора НЦИЛС ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-1116-3425. E-mail: strannik986@mail.ru

Абросимова Елизавета Евгеньевна – аспирант кафедры фармакологии и фармации ИНМФО ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-6472-6906. E-mail: abrosimova.volgmed@gmail.com

Бакулин Дмитрий Александрович – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории фармакологии сердечно-сосудистых средств НЦИЛС ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0003-4694-3066. E-mail: mbfdoc@gmail.com

Ковалев Николай Сергеевич – аспирант кафедры фармакологии и фармации ИНМФО ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-1116-3425. E-mail: kovalev.volgmed@gmail.com

Дубровина Марина Александровна – аспирант кафедры фармакологии и фармации ИНМФО ФГБОУ

ВО ВолгГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0003-1903-8589. E-mail: dubrovina.volgmed@gmail.com

Борисов Александр Владимирович – научный сотрудник лаборатории фармакологии сердечно-сосудистых средств НЦИЛС ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0003-0202-0008. E-mail: borissow1978@rambler.ru

Стрыгин Андрей Валерьевич – кандидат медицинских наук, доцент, заместитель директора НЦИЛС ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-6997-1601. E-mail: drumsav@mail.ru

Морковин Евгений Игоревич – кандидат медицинских наук, доцент, заведующий лабораторией нейропсихофармакологии НЦИЛС ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-7119-3546. E-mail: e.i.morkovin@gmail.com

Тюренов Иван Николаевич – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, заведующий лабораторией фармакологии сердечно-сосудистых средств НЦИЛС; заведующий кафедрой фармакологии и фармации Института НМФО ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0001-7574-3923. E-mail: fibfuv@mail.ru