

Оксид азота: роль в регуляции биологических функций, методы определения в крови человека

Метельская В. А., Гуманова Н. Г.

ГУ Государственный научно-исследовательский центр профилактической медицины Минздрава РФ, Москва

В обзоре приводятся современные литературные данные относительно физиологических и патобиологических характеристик важнейшей сигнальной молекулы организма – оксида азота (NO). Обоснована необходимость и обсуждаются различные методические подходы к количественной оценке NO-продуцирующей функции в условиях *in vivo*; дано описание модификации метода определения стабильных метаболитов оксида азота, позволяющей после депротеинизации сыворотки крови проводить одноэтапное количественное определение суммарных нитратов и нитритов. Сущность метода заключается в одновременном восстановлении нитратов в нитриты в присутствии хлористого ванадия и реакции диазотирования с последующим развитием окраски, интенсивность которой определяется спектрофотометрически при длине волны 540 нм. Отмечено, что простота исполнения, надежность и воспроизводимость метода позволят найти ему широкое применение в клинической практике для оценки уровня конечных метаболитов оксида азота, как ранних маркеров нарушения NO-продуцирующей функции сосудистого эндотелия.

Биосинтез и метаболизм оксида азота (NO) в организме человека – актуальная проблема теоретической и практической медицины. Анализируя действие нитроглицерина, который, как известно, расслабляет гладкую мускулатуру и, как следствие, является вазодилататором, др. Ф. Мюрад, впоследствии лауреат Нобелевской премии 1998 г., установил, что бесцветный, не имеющий запаха газ действует как сигнальная молекула. Это круто изменило отношение к оксиду азота, который еще недавно считался одним из основных компонентов, загрязняющих окружающую среду. На сегодняшний день он признан важнейшим медиатором, опосредующим удивительно широкий диапазон разно-

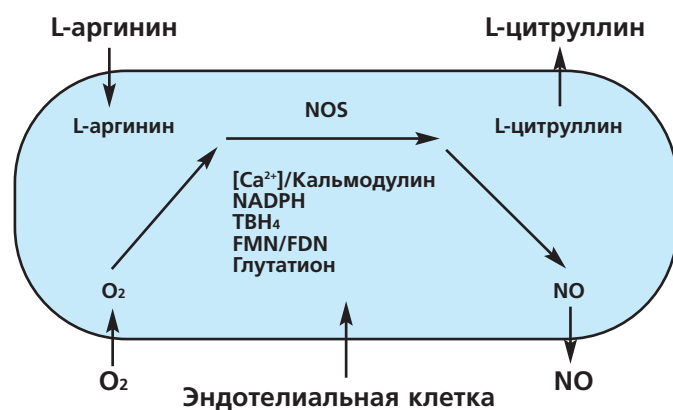
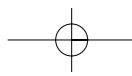


Рис. 1. Схема реакции синтеза оксида азота под действием eNOS. Фермент активируется в присутствии комплекса Ca^{2+} /кальмодулин при участии ряда кофакторов: никотинамидадениндинуклеотида восстановленного (НАДФН), 5,6,7,8-тетрагидробиоптерина (BH_4), флавиномононуклеотида/флавинадениндинуклеотида (ФМН/ФАД) и глутатиона. Субстратами реакции служат L-аргинин и молекулярный кислород (O_2), а ее продуктами являются оксид азота (NO) и L-цитруллин.

образных физиологических и патофизиологических процессов. Оксид азота регулирует тонус мелких и средних кровеносных сосудов, способствуя расслаблению гладкой мускулатуры, обладает антикоагулянтными свойствами, ингибируя активацию тромбоцитов, опосредует иммунный ответ и нейротрансмиссию [13, 37, 38].

Оксид азота, простой свободнорадикальный газ, образуется из аминокислоты L-аргинина под действием фермента синтазы оксида азота (NO-синтазы) (КФ 1.14.13.19; NOS) [17, 33]. На Рис. 1 представлена схема синтеза оксида азота. Кроме L-аргинина, в реакции участвуют молекулярный кислород, НАДФН и другие кофакторы – тетрагидробиоптерин (BH_4),



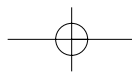


Рис. 2. Антиатерогенные эффекты оксида азота.

ФМН/ФАД, глутатион, ионы Ca^{2+} , кальмодулин. В ходе катализа помимо NO образуется L-цитруллин [29].

Производство оксида азота в организме млекопитающих катализируют три изоформы фермента NOS, две из которых – постоянно функционирующие ферменты: нейрональная (NOS I или nNOS) и эндотелиальная (NOS III, или eNOS) – NO-синтазы. [17]. Изоформы NOS I и NOS III, катализирующие синтез NO в небольших количествах, постоянно экспрессируются, соответственно, в нейронах и эндотелиальных клетках, поэтому называются конститутивными; для активации этих ферментов необходимы ионы Ca^{2+} и кальмодулин [16, 33]. Именно оксид азота, продуцируемый изоформой eNOS, является физиологически значимым вазодилататором, ингибитором агрегации и адгезии тромбоцитов, ингибитором пролиферации и миграции гладкомышечных клеток (ГМК) (Рис. 2). Снижение продукции и/или биодоступности NO, синтезирующегося в эндотелиальных клетках, считают одной из основных причин дисфункции эндотелия, имеющей место при таких патологических состояниях, как дислипидемия, в основном, гиперхолестеринемия, сахарный диабет 2 типа, артериальная гипертензия (АГ), сердечная недостаточность и др. [9, 14, 23].

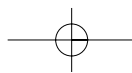
В отличие от вышеназванных изоформ, индуцибельная NOS (NOS II или iNOS) – эпизодически функционирующий фермент, впервые она была обнаружена в макрофагах, однако встречается во многих других клетках, включая ГМК, фибробласты, гепатоциты, клетки эпителия. Экспрессия этой изоформы индуцируется провоспалительными цитокинами (интерлейкин- 1β , TNF α) и бактериальными липополисахаридами, катехоламинами и другими агентами; для ее активации практически не требуются ионы Ca^{2+} [17]. Именно NO, продуцируемый в макрофагах под

действием iNOS, обуславливает их цитотоксическое и цитостатическое действие на опухолевые и бактериальные клетки. Индукция этого фермента и соответственно продукция оксида азота повышается при таких патологических состояниях, как сердечная недостаточность, кардиомиопатия, миокардит и др. [12]. Полагают, что индукция iNOS в кардиомиоцитах играет ключевую роль в развитии повреждений миокарда в большинстве сердечных патологий.

Оксид азота обладает уникальными свойствами, сочетая функции первичного и вторичного мессенджера с высокой диффузионной способностью, что обеспечивает возможность передачи сигнала на достаточно длинные дистанции от источника его синтеза [36]. Как первичный мессенджер, NO регулирует продукцию эндотелием таких биологически активных соединений, как простагландин, эндотелиальный фактор гиперполяризации (EDHF) и эндотелин-1 [16].

Прямые эффекты оксида азота, как вторичного мессенджера, связаны с его взаимодействием с гем-содержащими белками, и в первую очередь, с растворимой гуанилатциклазой, катализирующей синтез цГМФ в клетках [36, 37], и цитохромом P450 [43]. Наряду с этим оксид азота способен реагировать с негемовыми железо- и цинк-содержащими белками, с ненасыщенными жирными кислотами и тиоловыми группами белков с образованием нитрозотиолов, представляющих собой внутриклеточные хранилища («депо») оксида азота [11].

Концентрация NO является главным фактором, обуславливающим его биологический эффект. При низких концентрациях (< 1 мкМ) в основном преобладают прямые эффекты оксида азота, направленные на поддержание гомеостаза сердечно-сосудистой и нервной систем. При высоких концентрациях (> 1 мкМ) преобладающими становятся не прямые



эффекты, обусловленные образованием и последующим действием высокореакционноспособного соединения – пероксинитрита [11, 33].

Избыточная продукция оксида азота, приводящая к образованию пероксинитрита и опосредующая непрямые эффекты NO, зачастую носит патологический характер. Эти эффекты приводят к модификации различных макромолекул, включая белки, липиды и нуклеиновые кислоты [11, 37]. При избытке NO происходит инактивация железосодержащих ферментов митохондрий и торможение роста и размножения клеток. В сердечно-сосудистой системе избыток NO увеличивает проницаемость сосудов, что вызывает отеки тканей, а также оказывает прямое кардиотоксическое действие, приводя к стойкой генерализованной вазодилатации и выраженному падению артериального давления (АД). С избытком NO связывают и развитие септического шока, когда большое количество микробов, циркулирующих в крови, резко активируют синтез NO в эндотелии, что приводит к длительному и сильному расширению мелких кровеносных сосудов и к значительному снижению АД, с трудом поддающемуся терапевтическому воздействию. Эти же явления были описаны при геморрагическом, травматическом, анафилактическом, тепловом и кардиогенном шоке [2, 28].

Таким образом, в клетках, где экспрессируются конститутивные формы NO-синтазы, оксид азота образуется в относительно небольших количествах в течение короткого периода времени и оказывает положительное биологическое действие, в то время как индуцибельная NO-синтаза проявляет активность через 2–8 часов после внешнего воздействия на клетки, продуцируя огромные (в 100–1000 раз больше, чем конститутивные изоформы фермента) количества NO. При этом продукция NO удерживается на высоком уровне более длительное время – от нескольких часов до нескольких дней [29]. Иными словами, способность оксида азота выступать в роли физиологического регулятора или токсического соединения обусловлена экспрессией и активностью различных изоформ NO-синтазы [42].

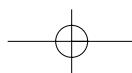
Наиболее мощным физиологическим стимулом постоянной продукции оксида азота эндотелием служит напряжение сдвига (shear stress), обусловленное давлением кровяного потока на стенки сосуда. [16, 39]. На культуре эндотелиальных клеток аорты быка было обнаружено, что напряжение сдвига усиливает экспрессию гена и белка eNOS, что сопровождается увеличением продукции оксида азота [41], тогда как отсутствие гена eNOS у трансгенных мышей [21] или

его мутация у человека [32] сопряжены с развитием эссенциальной гипертензии и инфаркта миокарда.

К немедикаментозным методам стимуляции NO-продуцирующей способности эндотелия относят дозированную адаптацию к умеренной физической нагрузке, сопровождающейся усилением скорости кровотока [22, 43], и к гипоксии [28]. Показано, что адаптация к этим воздействиям сопряжена с нормализацией сниженной эндотелиальной функции, при этом увеличение синтеза оксида азота может быть связано с увеличением активности eNOS и/или усилением ее экспрессии.

Наряду с этим возрастает интерес исследователей и к возможностям применения лекарственных препаратов для коррекции дисфункции эндотелия, обусловленной сниженной продукцией оксида азота. В литературе имеются данные о том, что гипопродукция оксида азота сопряжена с наличием нарушений в системе транспорта липидов (действие окисленных липопротеидов низкой плотности, ЛНП), гипергликемии, ишемии, повышенного АД и других факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний [14, 23]. Важно отметить, что в основном исследуется способность стимулировать NO-продуцирующую активность эндотелия с помощью уже известных и широко применяемых гиполипидемических и антигипертензивных препаратов. Так, показано, что гиполипидемическая терапия статинами сопровождается умеренным повышением уровня мРНК eNOS, обусловленным ее посттрансляционной стабилизацией [25]. Механизмы, ответственные за этот эффект, не связаны со снижением уровня внутриклеточного холестерина, а включают, скорее всего, ингибирование статинами посттрансляционной модификации (геранил-геранилирования) низкомолекулярного G-белка Rho, что приводит к его ингибированию и, как следствие, невозможности блокировать транскрипцию гена eNOS. Кроме того, G-белок Rho, лишенный преноидных звеньев, транслоцируется из цитозоля в мембрану клетки [25], что также сказывается на усилении экспрессии гена eNOS.

Получены убедительные данные о том, что в нормальных физиологических условиях ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента (АПФ), предотвращая распад брадикинина, усиливали у крыс экспрессию эндотелиальной NO-синтазы и, соответственно, биосинтез оксида азота. В то же время, при патологии – в условиях воздействия бактериальных полисахаридов – эти препараты угнетали индуцибельную изоформу фермента и снижали избыточную продукцию NO [7]. При инкубации культивируемых эндотелиальных клеток аорты крыс с антигипертензивными



препаратами из класса блокаторов кальциевых каналов также наблюдали повышение продукции NO [4, 13].

Имеются данные о том, что применение гормон-заместительной терапии эстрогенами у женщин в постменопаузе сопровождается стимуляцией синтеза NO [8]. Одним из перспективных подходов к сохранению биоактивности NO является и применение антиоксидантов, способствующих снижению концентрации реактивных форм кислорода, инактивирующих оксид азота [6].

Таким образом, биологические эффекты оксида азота в значительной мере определяются его биодоступностью, т. е. тонким равновесием между его продукцией под действием NO-синтазы, с одной стороны, и его утилизацией в тканях или инактивацией при участии супероксид радикалов, окисленных ЛНП и т. п. соединений, с другой [14]. Недостаточная продукция оксида азота сопряжена с развитием нарушений в сердечно-сосудистой и других системах организма; вместе с тем, его избыточная продукция, за счет которой обеспечивается антимикробный эффект при воспалении, может превратиться из звена адаптации в звено патогенеза и стать не менее опасным повреждающим фактором для организма, чем дефицит NO.

В связи с вышеизложенным, очевидной становится необходимость постановки адекватных лабораторных методов для количественной оценки NO-продуцирующей способности сосудистого эндотелия как в физиологических условиях, так и при его дисфункции, а также ее мониторинга при проведении клинических испытаний. Не менее актуальным представляется и определение степени избыточной продукции NO при различных патологических состояниях, сопровождающихся воспалением; очевидно, что в данном случае концентрация NO будет отражать активность индуцибельной изоформы NO-синтазы.

В то же время, понятно, что определение активности и/или экспрессии NO-синтазы, в частности, ответственной за продукцию оксида азота в сосудистом эндотелии, в условиях *in vivo* практически невозможно. В связи с этим предпринимаются попытки косвенно оценить NO-продуцирующую активность эндотелия у человека; одним из подходов к решению этого вопроса является определение концентрации основного продукта реакции, катализируемой NO-синтазой – оксида азота – в биологических жидкостях, в том числе в крови человека.

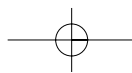
Поскольку оксид азота представляет собой быстро метаболизирующееся и короткоживущее соединение (время его полужизни в водной среде составляет не-

сколько секунд), его прямой количественный анализ в крови человека не представляется возможным. Для измерения концентрации оксида азота и оценки его биодоступности в условиях *in vivo* часто используют определение в сыворотке крови суммарного уровня стабильных конечных метаболитов оксида азота (NOx), т. е. нитритов и нитратов (NO₂⁻ и NO₃⁻, соответственно) [33]. Действительно, единственным стабильным конечным продуктом аутоокисления оксида азота в водной среде являются нитриты, тогда как при реакции NO с оксигемоглобином или супероксид радикалом образуются нитраты.

Адекватность определения уровня метаболитов оксида азота для оценки NO-продуцирующей активности эндотелия подтверждается данными исследований, проведенных на экспериментальных животных и человеке, где было показано, что уровень метаболитов NO в сыворотке крови достаточно точно отражает степень активности продуцирующего оксид азота фермента NO-синтазы [7, 19]. Более того, была обнаружена тесная взаимосвязь между «биохимическим индексом» продукции оксида азота (концентрация NOx в крови) и биологическим сигналом (уровень кровотока в предплечье) [26]. Немаловажным с практической точки зрения является и тот факт, что метаболиты NO в течение года стабильны при температуре -20°C, поэтому определение их уровня можно проводить в сыворотке крови, хранившейся в замороженном состоянии [35].

Необходимо также отметить, что определение метаболитов оксида азота как функции активности NO-синтазы оправдано в том случае, если исключены все не обусловленные активностью этого фермента источники нитратов. Таким образом, при оценке эндогенного синтеза оксида азота, прежде всего, следует учитывать состав диеты [19].

В литературе описан целый ряд методов количественной оценки конечных метаболитов оксида азота в различных биологических жидкостях, в том числе, в моче и сыворотке крови [1, 5, 30]. Для определения уровня метаболитов оксида азота используют флуоресцентные [24] и хемилюминесцентные [10] методы, капиллярный электрофорез [34], газовую хроматографию и масс-спектрометрию [40], высокоэффективную жидкостную хроматографию [15, 27], тогда как прямое определение оксида азота, например, при агрегации тромбоцитов, можно проводить с помощью электрохимических методов с применением NO-селективных микроэлектродов [18] или специальных анализаторов. Следует отметить, что все перечисленные методические подходы весьма сложны и трудоемки и требуют специаль-



ного лабораторного оснащения, поэтому наиболее приемлемым для клинической практики представляется колориметрическое измерение концентрации нитрит-иона с помощью реагента Грисса в реакции диазотирования, впервые описанной Griess в 1879 г. Поскольку реактив Грисса не позволяет определять нитрат, необходимо восстановить нитрат до нитрита; для этого используют бактериальную нитрат редуктазу из *Aspergillus nidulans* [19], либо ионы кадмия, цинка или ванадия [10, 28, 31].

Нами налажен и апробирован метод одноэтапного определения метаболитов оксида азота в сыворотке крови человека, который основан на ряде работ [10, 19, 31] с некоторыми модификациями [3]. Сущность метода заключается в одновременном восстановлении нитратов в нитриты в присутствии VCL₃ и реакции диазотирования образовавшимся нитритом сульфаниламида с последующим развитием розовой окраски, интенсивность которой определяется спектрофотометрически при длине волны 540 нм. Чувствительность метода, т.е. минимальная отличная от нуля концентрация нитрита, составляет 1,7 мкМ. Содержание суммарных метаболитов оксида азота, определенное с помощью предлагаемого метода в сыворотке крови добровольцев, колебалось от 37,2 до 87,2 мкМ, что было вполне сопоставимо с данными других исследователей: 25,0–58,3 мкМ [20, 35].

Заключение

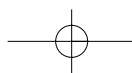
Исследования сигнальной функции оксида азота в регуляции сердечно-сосудистой и нервной систем насчитывают уже более двадцати лет, однако его роль с точки зрения клинического применения находится пока лишь на начальном этапе исследования. Удивляет многообразие биологических реакций и путей передачи сигнала, в которых оксид азота выполняет разнообразнейшие функции, являясь либо триггером, либо медиатором, либо эффектором. Более того, обнаружено и множество путей регуляции продукции этого соединения, как физиологических, присущих самому организму, так и внешних воздействий, включая медикаментозные и немедикаментозные способы коррекции NO-продуцирующей способности того или иного органа. В связи с этим представляется целесообразным, с одной стороны, оценивать недостаточность продукции оксида азота при эндотелиальной дисфункции и ее нормализацию под влиянием тех или иных корректирующих воздействий, а с другой – определять степень избыточной продукции оксида азота при воспалительных и других заболеваниях, сопряженных с избыточной продукцией NO. Иными словами, приоритетными категориями пациентов для оценки продукции NO по уровню его ста-

бильных конечных метаболитов можно считать больных с атеротромбозом, артериальной гипертонией, сахарным диабетом 2 типа, метаболическим синдромом.

Представленная в настоящей работе модификация метода позволяет после депротеинизации сыворотки с помощью этилового спирта проводить одноэтапное количественное определение стабильных метаболитов оксида азота в сыворотке крови. Имеются веские основания полагать, что простота исполнения, возможность использования микроколичеств исследуемого материала (100 мкл) высокая чувствительность, надежность и воспроизводимость метода позволят найти ему широкое применение в клинической практике для оценки уровня конечных метаболитов оксида азота, как ранних маркеров нарушения продукции оксида азота в организме.

Литература:

1. Виноградов Н.А., Журавлева И.А., Виноградов Н.А., Мелентьев И.А. Метод определения оксида азота в моче. Росс. Кард. Ж. 2003; № 3: 63-66.
2. Малышев И.Ю., Манухина Е. Б. Стресс, адаптация и оксид азота. Биохимия 1998; 63 (7): 992-1006.
3. Метельская В.А., Гуманова Н.Г. Скрининг-метод определения уровня метаболитов оксида азота в сыворотке крови человека. Клин. лаб. диагн., 2005; №6:15-18
4. Небиерезде Д.В., Сафарян А.С., Метельская В.А. и др. Антигипертензивная эффективность дилтиазема и его влияние на эндотелиальную функцию у мужчин с мягкой и умеренной артериальной гипертонией. Кардиоваск. терапия и профил. 2004; № 2: 4-9.
5. Омеляненко М.Г., Суховай Н.А., Назаров С.Б., Плеханов В.Г. Клиническое значение эндотелиальной дисфункции при остром коронарном синдроме без подъема сегмента ST у лиц в возрасте до 55 лет. Росс. Кард. Ж. 2003; № 4: 36-40.
6. Adams MA, Kinlay S, Blake GJ, et al. Atherogenic lipids and endothelial dysfunction: mechanisms in the genesis of ischemic syndromes. Annu Rev Med 2000; 51: 149-167.
7. Bachetti T, Comini L, Pasini E, et al. ACE-inhibition with quinapril modulates the nitric oxide pathway in normotensive rats. J Mol Cell Cardiol 2001; 33: 395-403.
8. Barret-Conner E, Bush TL. Estrogen and coronary heart disease. J Am Med Assoc 1991; 265: 1861-1867.
9. Boulanger CM. Secondary endothelial dysfunction: hypertension and heart failure. J Mol Cell Cardiol 1999; 31: 39-49.
10. Braman RS, Hendrix SA. Nanogram nitrite and nitrate determination in environmental and biological materials by vanadium (III) reduction with chemiluminescence detection. Anal Chem 1989; 61:2715-2718.



11. Davis KL, Martin E, Turko IV, Murad F. Novel effects of nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001; 41:203-236.
12. De Belder AJ, Radomski HJ, Why PJ et al. Myocardium calcium-independent nitric oxide synthase activity is present in dilated cardiomyopathy, myocarditis, and postpartum cardiomyopathy, but not in ischaemic or valvular heart disease. *Br Heart J* 1995; 74:426-430.
13. Ding Y, Vaziri ND. Calcium channel blockade enhances nitric oxide synthase expression by cultured endothelial cells. *Hypertension* 1998; 32: 718-723.
14. Drexler H. Nitric oxide and coronary endothelial dysfunction in humans. *Cardiovasc Res* 1999; 43: 572-579.
15. Everett SA, Dennis MF, Tozer GM et al. Nitric oxide in biological fluids: analysis of nitrite and nitrate by high performance ion chromatography. *J Chromatogr A*. 1995; 706: 437-442.
16. Fleming I., Busse R. NO: the primary EDRF. *J Mol Cell Cardiol*. 1999; 31: 5-14.
17. Forstermann U., Schmidt H. H. W., Pollock J. S. et al. Isoforms of nitric oxide synthase: characterization and purification from different cell types *Biochem. Pharmacol.* 1991; 42: 1849-1857.
18. Freedman JE, Kenay JF. Nitric oxide and superoxide detection in human platelets. In: *Methods enzymol.* 1999; 301: 61-72.
19. Granger DL, Anstey NM, Miller WC, Weinberg JB. Measuring nitric oxide production in human clinical studies. *Methods enzymol.* 1999; 301: 49-61.
20. Gueyara I, Iwanejko J, Dembinska-Kiec A, et al. Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. *Clin Chem Acta* 1998; 274: 177-188.
21. Huang PL, Huang Z, Mashimo H, et al. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* 1995; 377: 239-242.
22. Kimura T, Yokoyama T, Matsumura Y, et al. NOS3 genotype-dependent correlation between blood pressure and physical activity. *Hypertension* 2003; 41: 355-360.
23. Kojda G, Harrison D. Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res* 1999; 43: 562-571.
24. Kojima H, Nakatsubo N, Kikuchi K, et al. Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators, diaminofluoresceins. *Anal Chem* 1998; 70: 2446-2453.
25. Laufs U, Liao JK. Post-translational regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. *J Biol Chem* 1998; 273: 24266-24271.
26. Laurer T, Preik M, Rassaf T, et al. Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action. *Pros Natl Acad Sci USA*, 2001; 98: 12814-12819.
27. Li H, Meininger CJ, Wu G. Rapid determination of nitrite by reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 2000; 746: 199-207.
28. Manukhina EB, Malyshev IYu, Smitin BV, et al. Production and storage of nitric oxide in adaptation to hypoxia. *Nitric Oxide: Biol & Chem* 1999; 3: 393-401.
29. Marletta MA, Yoon PS, Iyengar R, et al. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry* 1988; 27: 8706-8711.
30. Marzinzig M, Nussler AK, Stadler J, et al. Improved methods to measure end products of nitric oxide in biological fluids: nitrite, nitrate, and S-nitrosothiols. *Nitric Oxide* 1997; 1:177-189.
31. Miranda KM, Espey MG, Wink D. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide: Biol & Chem* 2001; 5: 62-71.
32. Miyamoto Y, Saito Y, Kajiyama N, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene expression is positively associated with essential hypertension. *Hypertension* 1998; 32: 3-8.
33. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991; 43: 109-142.
34. Morcos E, Wiklund NP. Nitrite and nitrate measurement in human urine by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 2001; 22: 2763-2768.
35. Moshage H, Kok B, Huizenga JR, Jansen PL. Nitrite and nitrate determination in plasma: a critical evaluation. *Clin Chem* 1995; 6 (Pt 1): 892-896.
36. Murad F. The nitric oxide-cyclic GMP signal transduction system for intracellular and intercellular communication. *Recent Prog Horm Res* 1994; 49: 239-248.
37. Murad F. Discovery of some of the biological effects of nitric oxide and its role in cell signaling. *Biosci Rep* 1999; 19: 133-154.
38. Schmidt HH, Walter U. NO at work. *Cell* 1994; 78: 919-925.
39. Traub O, Berk BC. Laminar shear stress. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 677-693.
40. Tsikas D. Simultaneous derivatization and quantification of the nitric oxide metabolites nitrite and nitrate in biological fluids by gas chromatography/mass spectrometry. *Anal Chem* 2000; 72: 4064-4072.
41. Uematsu M, Ohara Y, Navas JP, et al. Regulation of endothelial cell nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress. *Am J Physiol* 1995; 269: C1371-1381.
42. Vassilakopoulos T, Deckman G, Kebbewar M, et al. Regulation of nitric oxide production in limb and ventilatory muscles during chronic exercise training. *Am J Physiol* 2003; 284: L452-L457.
43. Wink DA, Mitchell JB. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 1998; 25: 434-456.

