

В. Е. Охотин и А. В. Шуклин

ЗНАЧЕНИЕ НЕЙРОНАЛЬНОЙ, ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ И ИНДУЦИБЕЛЬНОЙ ИЗОФОРМ NO-СИНТАЗ В ГИСТОФИЗИОЛОГИИ СЕРДЕЧНОЙ МЫШЦЫ

Лаборатории нейроморфологии с группой электронной микроскопии (руков. — проф. В.Н.Швалев)
Российского кардиологического научно-производственного комплекса МЗ РФ и нейрогенетики и генетики развития
(зав. — чл.-кор. РАН Л.И.Корочкин) Института биологии гена РАН, Москва

Обзор обобщает данные о совокупности взаимоотношений между внутриклеточной локализацией NO-синтаз (NOS) и их регуляторными функциями в различных регионах отдельного кардиомиоцита в свете общей концепции L.Barouch и соавт. (2002), о внутриклеточной «пространственной компартментализации» изоформ NOS. В основе участия NO в деятельности кардиомиоцитов лежит сложная пространственная компартментализация NOS: нейрональной (NOS1), индуцибельной (NOS2) и эндотелиальной (NOS3), функция которых в сотни раз различается концентрациями вырабатываемого газа. Регуляторная роль конститутивных кальций-зависимых NOS1 и NOS3 связана с выработкой низких концентраций NO, которые вызывают ослабление сократимости кардиомиоцитов и снижение частоты сердечных сокращений. Напротив, кальций-независимая индуцибельная NOS2 появляется только в поврежденном миокарде с нарушенной сократительной функцией. NOS2 продуцирует высокие нерегулируемые концентрации NO, с которыми связана генерация пероксинитритов и цитотоксическое его действие. NOS3 ассоциирована с мембраной кавеол и Т-трубочек кардиомиоцита, в то время как NOS1 локализована на внутриклеточных мембранах саркоплазматической сети. Компартментализация изоформ NOS обеспечивает регуляцию различных звеньев NO-ергических сигнальных путей в миокарде, и этот принцип является ключевым в понимании противоречий, существующих в биологии NO в сердце. Изменения субклеточной компартментализации NOS ведут к повышению синтеза NO, снижению специфичности его влияния, расстройству механизмов кальциевого цикла, разобщению электрохимического сопряжения и нарушению сократимости миокарда. Обсуждаются механизмы избирательного действия различных NO-ергических регуляторных путей на активность пяти основных мишеней в пейсмейкерных и рабочих кардиомиоцитах.

Ключевые слова: NOS1, NOS2, NOS3, кардиомиоциты, субклеточная компартментализация.

Физиологически активная молекула — монооксид азота (NO) — один из мессенджеров в регуляции систем внутри- и межклеточной сигнализации [94]. Идентичный эндотелиальному фактору релаксации [57, 78], NO расслабляет гладкую мышечную ткань сосудов [9, 31, 76] и препятствует агрегации тромбоцитов и их адгезии к эндотелию [66]. Наряду с регуляторными функциями [5, 19, 41, 46], NO обладает цитотоксическими свойствами в различных тканях и органах [3, 13], включая сердце [29, 30, 52, 85, 87].

Все функции NO в сердце еще неизвестны [7, 10, 11]. В нем NO синтезируется в афферентных нервных волокнах и инкапсулированных рецепторных аппаратах [75], преганглионарных парасимпатических [83] и постганглионарных симпатических волокнах [71], нейронах интрамуральных ганглиев [53, 62, 95, 96], эндотелии сосудов [6, 62] и, наконец, в самих миоцитах [5, 7, 16, 19, 55]. Приведенный список широкого топографического распределения NO-синтезирующих систем указывает на мультифункциональность NO-ергической сигнализации в сердце. NO может модулировать функцию органа как через влияние на сосуды, так и непосредственно [7, 30, 68, 69]. В этом контексте особую важность приобретает прямое действие NO на сократимость миокарда, которое отличается весьма широким диапазоном — от тонкой регуляции электрохимического сопряжения до модуляции вегетативных сигналов на пре- и постсинаптическом уровне [19, 21, 52, 55].

В основе многостороннего участия эндогенного NO в кардиомиоцитах лежит сложная пространственная организация трех NO-синтаз (NOS) [4, 39, 67, 98]. Так как изменения их компартментализации приводят к глубоким нарушениям в кардиомиоцитах и развитию сердечной недостаточности [49], представляется актуальным изучение совокупности взаимоотношений между внутриклеточной анатомией NOS и их регуляторными функциями. Настоящая работа включает собственные исследования авторов и обобщает основной литературный материал по локализации функций этих изоформ в миокарде.

Локализация и распределение NOS в миокарде

В миокарде имеются все типы NOS [30, 69]: нейрональная (NOS1), открытая в мышце сердца только в 1999 г. [102], индуцибельная (NOS2) [87] и, наконец, эндотелиальная (NOS3) [20]. Между тем, каждый кардиомиоцит экспрессирует митохондриальную NOS (mtNOS) [23, 72], которая в систематике NOS рассматривается как подтип NOS1 [59].

При гистохимической реакции на NADPH-диафорузу (NADPH-d), электроинвазивно маркирующую в клетке NOS, на срезах миокарда наблюдается интенсивное окрашивание кардиомиоцитов у человека (рис. 1, а), кошки (см. рис. 1, б) и крысы (см. рис. 1, в). Синий преципитат солей формазана контурирует в

миоцитах исчерченность, характерную для поперечнополосатой мышечной ткани. Кроме того, постоянную положительную реакцию в миокарде предсердий и желудочков обнаруживают эндотелий сосудов и NO-ергические нервные волокна, идущие не всегда параллельно миоцитам и формирующие на их поверхности варикозные окончания (см. рис. 1, г). NO-ергических нейронов в миокарде нет, они выявляются в жировой ткани эпикарда.

При иммуногистохимической реакции на NOS1 в срезах миокарда человека наблюдается отчетливо выраженная исчерченность кардиомиоцитов (рис. 2). Сходный с NOS1 паттерн распределения имеют также белки саркоплазматической сети (CC) — Ca^{2+} -АТФаза, ее регулятор фосфоламбан и рианодиновые рецепторы (RyR) [102]; этот факт косвенно указывает на их общую компартментализацию в клетке.

Электронно-микроскопические исследования, проведенные в Институте Дж.Хопкинса [102] с использованием антител, конъюгированных с частицами коллоидного золота различного диаметра, окончательно разрешили проблему точной локализации NOS1 в кардиомиоцитах. Авторы установили [102], что фермент располагается на внутриклеточных мембранах CC, где солокализуется с RyR, Ca^{2+} -АТФазой и фосфоламбаном (рис. 3).

Иммуногистохимическая реакция на NOS2 (рис. 4, а) не выявляет в срезах желудочков сердца человека поперечную исчерченность, характерную для локализации NOS1. В условиях нормального онтогенеза иммунореактивность к NOS2 и NOS3 в миокарде крыс и мышей резко усиливается в середине пренатального развития, затем экспрессия NOS2 в мышечных клетках практически исчезает, а экспрессия NOS3 — снижается и выходит на базальный уровень взрослого организма [26, 27]. По имеющимся данным, при патологии у человека (ишемическая болезнь сердца, дилатационная кардиомиопатия) повышается иммунореактивность к NOS2 и NOS3 [40], а в условиях экспериментальной гипертрофии миокарда у крыс наблюдается усиление интенсивности окрашивания миоцитов при реакции на NADPH-d [14]. Следует отметить хорошо известный факт, что экспрессия NOS2 в кардиомиоцитах человека и животных вызывается цитокинами [61, 85, 87, 98]. Увеличение их содержания неизменно сопровождается сердечную недостаточность [97].

NOS3 (см. рис. 4, б) в отличие от NOS1 располагается в другом компартменте кардиомиоцитов — небольших (70–90 нм в диаметре) впячиваниях плазмолеммы — кавеолах [36, 44, 63]. Структуру кавеолы поддерживает кавеолин-3 [44, 90]. Кавеолами богаты мембраны Т-трубочек, участвующих в электромеханическом сопряжении при передаче возбуждения в миокарде [36, 48, 51].

Таким образом, конститутивные мембранно-связанные NOS1 и NOS3 пространственно разделены и распределяются между различными компартментами кардиомиоцита. Индуцибельная NOS в отличие от мембранно-связанных изоформ NOS является лабильной и располагается в цитозоле клетки [40].

Характеристика конститутивной и индуцибельной изоформ NOS в миокарде

Различие в ультраструктурной локализации NOS определяет физиологическое влияние NO в миокарде. Разделение NOS на конститутивные и индуцибельные отвечает двум разноплановым NO-ергическим эффектам, которые обусловлены в сотни раз отличающимися концентрациями вырабатываемого газа.

Кальций-независимая индуцибельная NOS2 продуцирует большие количества NO, высокореактивная молекула которого способна участвовать в метаболических превращениях с образованием еще более активных свободнорадикальных соединений и неспецифически повреждать белки и ненасыщенные жирные кислоты клетки. С ее функцией связаны цитотоксическое и проапоптотическое влияния NO [17, 47].

Регуляторная роль конститутивных кальций-зависимых NOS1 и NOS3 связана с выработкой низких концентраций NO [2, 5, 52], активацией растворимой гуанилатциклазы (sGC) и выходом на сигнальный путь вторичного мессенджера циклического гуанозинмонофосфата (cGMP). NO в этих условиях вызывает: а) вазодилатацию [2, 7, 11]; б) ослабление сократимости миоцитов [18, 88]; в) снижение частоты сердечных сокращений [19, 30, 68]; г) облегчение парасимпатического и подавление симпатического влияния [55, 69, 79].

Локализация и функции NOS в кардиомиоците

NO как нейромодулятор участвует в автономной афферентной и эфферентной иннервации миокарда. Наряду с его нейромодуляторным действием в составе нервных волокон, нас интересует вопрос об эндогенной роли NO в кардиомиоцитах. Какова роль изоформ NOS, синтезирующих NO, в различных регионах отдельного кардиомиоцита?

NOS1 регулирует активность белков в CC кардиомиоцита. Изучению роли NOS1 в кардиомиоците предшествовали опыты *in vitro*, в которых была установлена способность NO увеличивать вероятность открытой конформации RyR второго типа (RyR2) [103].

Сейчас мы знаем, что NOS1, как и RyR2, располагается на мембране CC и что через каналы этих рецепторов из CC поступает Ca^{2+} , вызывающий сокращение мышечных волокон. Солокализация NOS1 и RyR2 в одном клеточном компартменте [102] является достаточным основанием для предположения об участии фермента в NO-ергической стимуляции кальциевого выброса и усиления сократимости миокарда [21]. Однако эта гипотеза оказалась не безупречной. Исследования кардиомиоцитов у мышей, нокаутных по NOS1, так же как специфическое ингибирование фермента в этих клетках у животных без нокаута, отчетливо показали, что NOS1 скорее уменьшает, а не увеличивает их сократимость [18, 88]. Таким образом, полученные данные *pro* и *contra* еще не позволяют сделать однозначного вывода о механизме влияния NOS1 на сократимость миокарда [79, 88]. L.Xu и соавт. [103] и A.J.Lokuta и соавт. [65] показали, что на изменения в цикле Ca^{2+} влияет прямое связывание NO (S-нитрозилирование) с RyR [103] и с Ca^{2+} -АТФазой внутриклеточных цистерн [65] (таблица).

Основные мишени и механизмы действия NO-ергических регуляторных путей в кардиомиоците

Мишень кардиомиоцита	Механизмы действия NO-ергических регуляторных путей	Авторы
Белки каналов, контролируемые I_f (I_f — токи, активируемые гиперполяризацией)	$NO \rightarrow sGC \rightarrow cGMP \rightarrow I_f$ [NO активирует растворимую гуанилатциклазу (sGC); sGC вырабатывает циклический гуанозинмонофосфат (cGMP); cGMP непосредственно повышает активность каналов, контролируемых I_f]	56, 74
МФ — миофиламенты сократительного аппарата	$NO \rightarrow sGC \rightarrow cGMP \rightarrow PKG \rightarrow \text{МФ}$ [cGMP через протеинкиназу G (PKG) фосфорилирует белки МФ и снижает их сродство к Ca^{2+} цитозоля]	69
Кальциевые каналы, проводящие токи $I_{Ca,L}$ ($I_{Ca,L}$ — кальциевые токи L-типа)	$NO \rightarrow sGC \rightarrow cGMP \rightarrow PKG \rightarrow I_{Ca,L}$ [PKG снижает активность белков кальциевых каналов L-типа]	29, 85
	$NO \rightarrow sGC \rightarrow cGMP \rightarrow PDE2 \rightarrow cAMP \rightarrow PKA \rightarrow I_{Ca,L}$ [cGMP активирует фосфодиэстеразу 2 (PDE2); PDE2 вызывает гидролиз циклического аденозинмонофосфата (cAMP), тем самым блокирует β -адренергическую активацию $I_{Ca,L}$]	29, 41, 45, 46
RyR2 — рианодинные рецепторы саркоплазматической сети	$NO \rightarrow RyR2$ [NO напрямую S-нитрозилирует RyR2 и повышает их активность]	21, 103
	$NO \rightarrow ADP \rightarrow RyR2$ [NO через ADP-рибозилтрансферазу снижает активность RyR2]	101
SERCA2 (SarcoEndoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase) — Ca^{2+} -АТФаза саркоплазматической сети кардиомиоцитов	$NO \rightarrow SERCA2$ [NO напрямую S-нитрозилирует Ca^{2+} -АТФазу и снижает ее активность]	65

NOS2 опосредует цитотоксическое воздействие NO в миокарде при патологии. Индукция NOS в миокарде впервые установлена еще в 1992 г. [87]. NOS2 в отличие от NOS1 и NOS3 отсутствует в нормальном кардиомиоците, фермент выявляется в иммунных клетках, главным образом в CD68⁺-макрофагах [40]. Появляется NOS2 только в поврежденном миокарде, где ее экспрессия вызывает индукцию апоптоза [17, 47].

История исследования NOS2 в сердце связана с изучением механизма резкого снижения сократительной функции миокарда под влиянием провоспалительных цитокинов. В 1993–1995 гг. было обнаружено уменьшение сократимости отдельных кардиомиоцитов в среде, содержащей активированные макрофаги легких [98]. В последующие годы механизм этого явления был охарактеризован как цитокин-зависимая аутокринная индукция NOS2 в кардиомиоцитах [54, 61, 98].

У человека при инфаркте миокарда и хронической сердечной недостаточности значительно увеличивается синтез NO [13]. Гиперпродукция NO в этих условиях отрицательно сказывается на функции сердца [30, 69]. Специфическое ингибирование NOS2 у крыс с инфарктом, вызванным перевязкой коронарной артерии, приводило к улучшению функции сердца, уменьшению зоны инфаркта и снижению смертности животных [85]. Повреждающее действие больших концентраций NO, которые вырабатывает NOS2, связывают с образованием пероксинитрита-аниона (ONOO⁻). Последний после протонирования превращается в неустойчивое соединение ONOON, которое легко распадается с образованием диоксида азота — $\cdot NO_2$ и $\cdot OH$ -радикалов [5, 11, 35, 77].

Имеются механизмы, препятствующие повреждающему действию NOS2 в миокарде. К одному из них относится протективное действие миоглобина на мышечные клетки в условиях оксидативного стресса, связанного с образованием NO и продуктов его превращения [42].

Локализация NOS3 в сарколемме кардиомиоцита определяет влияние фермента на пейсмекерные и входящие кальциевые токи, а также на регуляторные пути M-холино- и β -адренорецепторов. NOS3 располагается в кавеолах сарколеммы, где фермент ассоциирован с кавеолином-3 [36]. В результате NOS3 получает реципрокное регуляторное влияние: от кавеолина-3 —

ингибирующее, а со стороны кальций/кальмодулина — активирующее [70].

Предполагается [68], что увеличение содержания внутриклеточного кальция в результате стимуляции специфическими агонистами инициирует каталитическую активность NOS3 посредством удаления «ингибирующего» кавеолина и связывания «активирующего» кальция/кальмодулина с соответствующим доменом в структуре фермента. Вопрос о том, требуется ли для этого обязательная транслокация NOS3 за пределы кавеолы, остается не выясненным [68]. На функцию NOS3 также оказывают влияние механическое растяжение мембраны и транслокация в кавеолы активированных M_2 -холинорецепторов [37, 44, 80].

Функция NOS3 впервые описана J.-L. Balligand и соавт. [19] при исследовании пейсмекерных клеток сердца. Установлено, что доноры NO уменьшают частоту спонтанных сокращений адренергически престаимированных пейсмекерных клеток [19]. Два года спустя было выяснено, что уменьшение частоты потенциалов действия пейсмекерных клеток и соответственно отрицательный хронотропный эффект в здоровом сердце вызывает NOS3, опосредуя в этой ситуации холинергическое влияние [20]. Позднее это направление исследований получило развитие в работах, которые продемонстрировали возможность стимуляции NOS3 холинергическими агонистами [29, 45, 46].

Активация M_2 -холинорецепторов вызывает их динамическую транслокацию в кавеолы [37], а взаимодействие с NOS3 [36] приводит к усилению синтеза NO, активации sGC и повышению концентрации cGMP в клетке (рис. 5). Последний через активацию фосфодиэстеразы-2 (PDE2) снижает концентрацию циклического аденозинмонофосфата (cAMP), блокируя β -адренергическое влияние (см. таблицу). Рис. 5 иллюстрирует способность NOS3 опосредовать cGMP-ергические влияния агонистов M_2 -холинорецепторов в пейсмекерных клетках, помимо регуляторного пути, связанного через G-белки с инактивацией аденилатциклазы.

Интересны новейшие данные о взаимодействии ингибирующих путей в регуляции кардиомиоцитов предсердий. При инактивации ингибиторной субъединицы (G_i) G-белка с помощью токсина коклюша происходит компенсаторная гипертрофия параллельного

NO-ергического регуляторного пути (см. рис. 5), что проявляется в виде увеличения общего содержания NOS3 в предсердиях мышей [33] и сердце крыс [50].

Имеются работы, которые оспаривают роль регуляторного пути $\text{NOS3} \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{sGMP}$ в изменении частоты сердечных сокращений (ЧСС) [24, 42, 99]. Однако анализ, проведенный N.Herring и соавт. [55], показал, что расхождения точек зрения в этом случае могут быть связаны с различием в возрасте экспериментальных животных. Возраст может иметь особенно большое значение в свете данных о переходе в онтогенезе регуляции пейсмейкинга с NO-ергического сигнального пути на аденилатциклазный [58].

Доноры NO, например нитропруссид натрия, могут повышать ЧСС. Причиной увеличения ЧСС в таких случаях является sGMP-зависимая стимуляция гиперполяризационных токов I_f [56, 74]. В ситуации, которая характеризуется повышенным адренергическим фоном, неспецифические ингибиторы NOS способны лишь отсрочить вызванное ацетилхолином, снижение ЧСС [89]. Здесь NO играет роль «тормоза», препятствующего через активацию I_f резкому снижению ЧСС [55].

В рабочих кардиомиоцитах NOS3 участвует в тоническом ингибировании потенциал-зависимых Ca^{2+} -токов через каналы L-типа ($I_{\text{Ca,L}}$) [41], которые определяют инотропный ответ сердца [1, 12]. По-видимому, существует система с отрицательной обратной связью, поскольку приток кальция в кардиомиоциты повышает активность в них NOS3 [60]. На этот процесс не влияет инактивация G-белков, а его регуляторный путь идет через $\text{NO} \rightarrow \text{sGC} \rightarrow \text{sGMP} \rightarrow \text{PDE2}$ [41] (рис. 6). Тоническое ингибирование $I_{\text{Ca,L}}$ в рабочих кардиомиоцитах морской свинки маскируется β -адренергическим агонистом — карбахолом [41].

В течение раннего онтогенеза вклад NOS3 в модуляцию β -адренергического влияния несколько снижается. У крыс и мышей наибольшее содержание NOS3 в миокарде наблюдается в середине внутриутробного развития, далее следует снижение содержания фермента [26, 27], что связано, как отмечено нами выше, с переходом на аденилатциклазный регуляторный путь [58].

У человека значение NOS3 и ассоциированного с ней кавеолина при патологии кардиомиоцитов еще не изучено. У собак с гипертрофической кардиомиопатией, вызванной экспериментальной почечной гипертензией, происходит уменьшение содержания кавеолина и NOS3 в ткани левого желудочка [82]. Сходные изменения происходят у спонтанно гипертензивных крыс (SHR) [81].

Пространственная компартментализация NOS — ключ к пониманию противоречий в кардиобиологии NO

Итак, все изоформы NOS экспрессируются в пределах кардиомиоцита. Зачем требуется такое разнообразие изоферментов, катализирующих идентичную реакцию в одной и той же клетке? По какому пути идет наука в понимании самых элементарных взаимоотношений между функциями этих изоформ в миокарде?

Функция становится объяснимой, если известна структура. Поэтому поворотным пунктом в развитии

представлений о роли NOS в миокарде можно считать открытие ее нейрональной изоформы в СС кардиомиоцитов [102]. Вслед за этим открытием было установлено, что каждая изоформа NOS обладает высокоспецифичной функцией и субклеточной локализацией, или компартментом, где она экспрессируется. Эти факты привели к построению общей концепции о внутриклеточной «пространственной компартментализации» (spatial confinement) изоформ NOS [21].

Согласно концепции, NO-ергическое воздействие определяется не столько самим NO, сколько биологически активными белками, непосредственно окружающими NOS [21, 30, 55, 69] (см. таблицу). При этом, свободный NO, вырабатываемый конститутивными NOS, не диффундирует на значительные расстояния, а оказывает модулирующее влияние на активность белков своего субклеточного компартмента [52].

Оригинальное и получившее широкое распространение в мировой литературе представление об аналогичном характере активности NO в биологических системах сформулировано А.Ф.Ваниным [2, 3, 100]. В его лаборатории продемонстрировано, что в такой химически гетерогенной и активной среде, как цитозоль, молекула NO практически мгновенно связывается различными сквенджерами [3], к которым относится и sGS — основная физиологическая мишень NO, или, как ее еще называют, «рецептор» NO [11, 30, 100]. Концепция компартментализации объясняет сосуществование различных изоформ NOS и выполнение ими неодинаковых функций в пределах одной мышечной клетки. Хотя данные пионерской работы [21] о противоположном характере влияния NO, вырабатываемого NOS1 и NOS3, на сократимость кардиомиоцитов не подтвердились [18, 88], сейчас уже очевидно, что названные изоформы NOS участвуют в модуляции различных внутриклеточных процессов.

Кальциевый цикл и значение NOS1 и NOS3 в регуляции сокращения и расслабления кардиомиоцита

Регуляторные функции NOS1 и NOS3 связаны с механизмами переноса ионов кальция как через плазмолемму, так и через внутренние мембраны кардиомиоцитов. Циклические перемещения Ca^{2+} из СС в цитозоль являются ключевыми при сокращении и расслаблении миокарда, где они обеспечивают взаимосвязь между деполяризацией плазмолеммы кардиомиоцита и его сокращением.

Сокращению кардиомиоцита предшествуют ряд последовательных процессов: 1) электрическая деполяризация плазмолеммы (сарколеммы); 2) вход небольшого количества кальция из межклеточного вещества в кардиомиоцит; 3) поступление больших количеств кальция из СС в цитозоль кардиомиоцита и, наконец, 4) связывание кальция с тропонином С миофиламентов. Перемещение кальция здесь является связующим звеном между потенциалом действия и скольжением миозина вдоль актиновых филаментов, что в итоге приводит к сокращению миоцита. Вышеописанный механизм (см. рис. 6) известен в англоязычной литературе как «excitation-contraction coupling», или электромеханическое сопряжение [25, 48].

Деполяризация сарколеммы активирует потенциал-зависимые токи Ca^{2+} L-типа ($I_{\text{Ca,L}}$) [1]. Каналы

- Рис. 1. NADPH-диафораза в продольных срезах миокарда правого предсердия человека (а), кошки (б), крысы (в) и кролика (г).
Продукт гистохимической реакции интенсивно окрашивает миоциты и контурирует их поперечную исчерченность. В миокарде кролика отчетливо выявляются продольные и поперечные нервные волокна.
- Рис. 2. NOS1 (нейрональная NOS) в продольных срезах миокарда правого предсердия человека.
Иммуногистохимическое окрашивание с использованием DAB-хроматофильного агента.
- Рис. 3. NOS1 в отдельном пузырьке (стрелки), выделенном из фракции саркоплазматической сети, полученном при центрифугировании кардиомиоцитов кролика.
Рисунок с электронной микрофотографии из работы K.Y.Xu et al. [102]. NOS1 выявлена иммуногистохимически с помощью анти-тел, конъюгированных с частицами коллоидного золота. Диаметр каждой частицы составляет 12 нм.
- Рис. 4. NOS2 (а) и NOS3 (б) в продольных срезах миокарда правого предсердия человека.
а, б — паттерн окрашивания миоцитов не выявляет исчерченности, характерной для локализации NOS1; б — продукт реакции выявляется в сосудах и миоцитах. а — материал взят после трансмурального инфаркта. Иммуногистохимическое окрашивание с использованием DAB-хроматофильного агента.
- Рис. 5. NOS3 в пейсмекерном кардиомиоците [по данным 37, 45, 46, 74, 86].
Возбуждение β -адренорецепторов последовательно активирует G-белок, аденилатциклазу (AC) и повышает содержание циклического аденозинмонофосфата (сAMP), который при участии протеинкиназы А (PKA) опосредует стимулирующее влияние на кардиомиоцит. NOS3 при этом является звеном одного из путей, регулируемых M_2 -холинорецепторами, наряду с классическим аденилатциклазным. Стимуляция M_2 -холинорецепторов повышает активность NOS3 [37], синтез NO и активирует растворимую гуанилатциклазу (sGC), что приводит к повышению содержания циклического гуанозинмонофосфата (сGMP). Последний, через активацию фосфодиэстеразы второго типа (PDE2), вызывает гидролиз сAMP и подавляет β -адренергическое влияние [45, 46]. сGMP способен также ингибировать через протеинкиназу G (PKG) потенциалзависимые кальциевые токи L-типа ($I_{Ca,L}$) [86]. Увеличение частоты сердечных сокращений, наблюдаемое в эксперименте как парадоксальная реакция, вызываемая влиянием доноров NO, связана, очевидно, со стимулирующим влиянием сGMP на входящие токи, активируемые гиперполяризацией (If) [74].
- Рис. 6. Субклеточная пространственная компартментализация конститутивных кальций-зависимых изоформ NOS и их регуляторные пути в рабочем кардиомиоците (сводная схема, составленная по данным оригинальных работ [21, 36, 41, 60, 65, 86, 102, 103]).
В кардиомиоците сосуществуют обе конститутивные изоформы NOS, что послужило основой для концепции об их субклеточной пространственной компартментализации в пределах клетки [21]. Их активность связана с периодическими изменениями концентрации ионов кальция в цитозоле, которая зависит от частоты сокращений кардиомиоцита [60]. NOS1 локализована в саркоплазматической сети [102], где NO непосредственно взаимодействует с белками риаинодиновых рецепторов второго типа (RyR2) [103] и кальциевой АТФазы (SERCA) [65], управляющих циклом кальция в сокращающемся миоците. NOS3 ассоциирована с плазмолеммой [37] кавеол Т-трубочек. В этом компартменте активность NOS3 ингибируется кавеоллином-3, а активируется — Ca^{2+} /кальмодулином (CaM). NO, вырабатываемый NOS3, активирует регуляторный путь вторичного мессенджера сGMP [41]. NOS3 тонически ингибирует приток кальция в цитозоль кардиомиоцита, путем подавления активности $I_{Ca,L}$ [41]. Снижение активации $I_{Ca,L}$ может вызвать: 1) гидролиз сAMP с помощью сGMP-активируемой фосфодиэстеразы (PDE2), что предотвращает активирующее фосфорилирование $I_{Ca,L}$ через PKA [41]; 2) активация PKG [86], которая опосредует ингибирующее фосфорилирование канала $I_{Ca,L}$. Остальные обозначения те же, что на рис. 5.
- Рис. 7. Транслокация NOS1 (показана синим цветом) из саркоплазматической сети кардиомиоцита в кавеолы плазмолеммы при дилатационной кардиомиопатии человека (схема составлена по данным: 32, 37, 49).
Поражение миокарда приводит к увеличению содержания кавеоллина-3, опорного пептида кавеол [51]. В этих условиях в кавеолах, где в норме присутствует только NOS3, появляется NOS1, ассоциированная с кавеоллином-3 [32]. Нарушение компартментализации NOS за счет уменьшения количества NOS1 в саркоплазматической сети ведет к расстройству регуляции кальциевого цикла. С другой стороны, увеличение суммарной NOS в кавеолах приводит к ослаблению $I_{Ca,L}$ и создает предпосылки для развития нарушений сократительной функции миокарда.

для их обеспечения находятся в углублениях плазмолеммы — Т-трубочках [68], а к ним примыкают цистерны СС, которые в диастолу содержат высокие концентрации Ca^{2+} . Небольшие количества Ca^{2+} , поступающие в кардиомиоциты из межклеточного вещества (в составе $I_{Ca,L}$), приводят к мощному сбросу Ca^{2+} из СС в цитозоль (через RyR2) [48]. В результате «сброса кальция под действием кальция» (Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release) последний связывается с тропонином С, вызывая активацию миофиламентов и последующее сокращение мышцы [25, 34].

Если сокращение кардиомиоцита требует поступления кальция из СС в цитозоль, то его релаксация, напротив, обусловлена «закачиванием» кальция из цитозоля в цистерны СС. Обратное поступление кальция против градиента концентрации обеспечивает фосфоламбан-регулируемая Ca^{2+} -АТФаза (SERCA2) [25, 104], которой богаты мембраны СС. Кроме того, кальций может выводиться через сарколемму при помощи Na^+/Ca^{2+} -обменника, работающего одновременно с «насосом» СС — Ca^{2+} -АТФазой [22, 25]. Эти процессы приводят к понижению кон-

центрации кальция в цитозоле и диссоциации комплекса кальций—тропонин С, что вызывает освобождение миозина от актиновых филаментов и расслабление кардиомиоцита. Кальциевый цикл в рабочем миокарде характеризуется периодическими изменениями концентрации Ca^{2+} в цитозоле от 100 нМ в расслабленном состоянии кардиомиоцита до 1 мМ при его сокращении [25].

Из описанной картины кальциевого цикла вполне естественно вытекает вопрос: в каком соотношении между собой находятся факторы, влияющие на прекращение сброса кальция через RyR? Поскольку деактивация RyR2 [91], их адаптация [38], равно как и истощение пула Ca^{2+} в цистернах СС происходят в кардиомиоците, то, как полагают некоторые авторы, в мышце сердца имеет место синергичное влияние этих факторов [104].

Расстройства в механизмах кальциевого цикла могут происходить в результате изменения субклеточной компартментализации как NOS1, так и NOS3 [48, 49], что ведет к потере специфичности влияния

NO, разобщению электромеханического сопряжения и нарушению сократимости миокарда [104].

Нарушение компартментализации конститутивных NOS в кардиомиоцитах как предпосылка развития сердечной недостаточности

Нарушения субклеточного распределения NOS1 и NOS3 в кардиомиоцитах связывают с развитием различных патологических состояний миокарда [32, 49]. В сердце человека при дилатационной кардиомиопатии происходит транслокация NOS1 из СС в плазмолемму [32]. Этот процесс протекает в результате ассоциации NOS1 с кавеолоином-3, который располагается в сарколемме, что приводит к перераспределению конститутивных изоформ NOS в кардиомиоците (рис. 7). В кавеолах эти процессы сопровождаются увеличением образования NO и последующим нарушением механизмов регуляции кальциевых каналов сарколеммы.

Уменьшение содержания NOS1 в СС влияет на регуляцию RyR2, что может приводить к нарушению сброса Ca^{2+} . Взаимодействие кальциевого цикла сарколеммы и кальциевого цикла СС происходит на фазе нарастания притока Ca^{2+} [48]. Десинхронизация обоих циклов сопровождается снижением скорости повышения концентрации Ca^{2+} [64, 84], что, в свою очередь, вызывает несинхронное связывание кальция с тропонином С, и, таким образом, снижает скорость сокращения кардиомиоцита [92]. Уменьшение содержания Ca^{2+} в СС, как правило, вызывает снижение порога, при котором наступает частичный выход Ca^{2+} из цистерн СС, что усиливает вероятность aberrантного сброса (или спонтанной утечки Ca^{2+}) при низких концентрациях внутриклеточного Ca^{2+} в цитозоле. Таким образом, спонтанная утечка Ca^{2+} может инициировать задержку релаксации и тем самым способствовать нарушению сокращения миокарда и аритмии [28].

Заключение

Основной проблемой в изучении физиологической роли NO является способность одной и той же молекулы опосредовать как регуляторные, так и цитотоксические влияния. По этой причине двойственный характер NO сравнивают в положительном и отрицательном смысле с двуликим Янусом [8, 43, 64, 73, 93]: в сердце NO тонко регулирует холинергическую трансмиссию, но вызывает пероксинитритный стресс; участвует в аутогенной релаксации кардиомиоцитов, но может способствовать их элиминации путем апоптоза; вызывает релаксацию коронарных сосудов, но способен усугублять течение инфаркта миокарда.

Сложность проблемы изучения регуляторных функций NOS заключается в известном антагонизме NO-ергической сигнализации в деятельности мышцы сердца, где NO способен и уменьшать, и увеличивать частоту потенциалов действия пейсмейкерных клеток; регулировать перенос ионов кальция как через сарколемму, так и через мембрану цистерн СС; ослаблять сократимость миокарда во время систолы и усиливать диастолическую релаксацию [68, 69].

Открытие внутриклеточной локализации и специфических функций изоформ NOS в кардиомиоци-

те разрешило многие трудности, связанные с конкретным пониманием NO-ергического влияния на деятельность сердца [49]. Стало очевидным, что подлинными свойствами NO заключены не только в нем самом, а объясняются различной компартментализацией NOS, которые как бы воспроизводят, направляют и регулируют различные проекции или точки приложения NO-ергического воздействия [21].

Многие проблемы кардиобиологии NO еще ждут своего разрешения. Требуют выяснения механизмы регуляторного влияния NOS1 в СС кардиомиоцита. Не вполне понятна общая регуляция экспрессии конститутивных изоформ в норме и патологии.

Наконец, требует обсуждения вопрос о необходимости наличия всех NOS в кардиомиоцитах. У мышей генетический нокаут NOS1 или NOS3 либо «выключение» обеих изоформ [18, 21, 24, 88] не вызывает летального исхода, однако приводит к артериальной гипертензии и гипертрофии левого желудочка. Можно заключить, что NO не является облигатным мессенджером в сердце и опосредует параллельные или дополнительные регуляторные пути, что наиболее отчетливо демонстрирует взаимодействие NOS3 с M_2 -холинорецепторами (см. рис. 5). Однако в таком жизненно важном органе, как сердце, любая регуляторная система имеет большое значение, особенно для потенциального терапевтического воздействия. Кроме того, как полагает Е.И.Чазов [15], динамический баланс регуляторных процессов является необходимым условием нормального функционирования сердца.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алипов Н.Н. Пейсмейкерные клетки сердца: электрическая активность и влияние вегетативных нейромедиаторов. Успехи физиол. наук, 1993, т. 24, №2, с. 37–69.
2. Ванин А.Ф. Оксид азота в истории биологии: история, состояние, перспективы исследования. Биохимия, 1998, т. 63, №7, с. 867–869.
3. Ванин А.Ф. Динитрозильные комплексы и S-нитрозотиолы — две возможные формы стабилизации и транспорта оксида азота в биосистемах. Биохимия, 1998, т. 63, №7, с. 924–938.
4. Горрен А.К. и Майер Б. Универсальная и комплексная энзимология синтазы оксида азота. Биохимия, 1998, т. 63, №7, с. 870–880.
5. Капелько В.И. Регуляторная роль кислородных радикалов в миокардиальных клетках. Росс. физиол. журн., 2004, т. 90, №6, с. 681–692.
6. Мазур Н.А. Дисфункция эндотелия, монооксид азота и ишемическая болезнь сердца. Тер. арх., 2003, т. 73, №3, с. 84–86.
7. Марков Х.М. Оксид азота и сердечно-сосудистая система. Успехи физиол. наук, 2001, т. 32, №3, с. 49–65.
8. Охотин В.Е., Калиниченко С.Г. и Дудина Ю.В. NO-ергическая трансмиссия и NO как объемный нейромедиатор. Влияние NO на механизмы синаптической пластичности и эпилептогенез. Успехи физиол. наук, 2002, т. 33, №2, с. 41–55.
9. Охотин В.Е. и Куприянов В.В. Нейровазальные отношения в новой коре головного мозга человека. Морфология, 1996, т. 110, вып. 4, с. 17–22.

10. Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Косицин Н.С. и Охотин В.Е. Проблема оксида азота в биологии и медицине и принцип цикличности: ретроспективный анализ идей принципов и концепций. М., Едиториал УРСС, 2003.
11. Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Охотин В.Е. и Косицин Н.С. Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих. М., Наука, 1997.
12. Розенштраух Л.В., Сакс В.А., Юриавичус И.А. и др. Влияние креатинфосфата на медленные входящие кальциевые токи, потенциалы действия и силу сокращений предсердий и желудочков лягушки. Биохим. мед., 1979, т. 21, №1, с. 1–15.
13. Стокле Ж.-К., Мюлле Б., Андрианцитохайна Г. и Клещев А. Гиперпродукция оксида азота в патофизиологии кровеносных сосудов. Биохимия, 1998, т. 63, №7, с. 976–983.
14. Тищенко О.В., Елисеева Е.В. и Мотавкин П.А. Значение оксида азота в развитии гипертрофии сердца в условиях экспериментальной почечной гипертензии. Цитология, 2002, т. 44, №3, с. 263–269.
15. Чазов Е.И. Вклад нарушений регуляторных механизмов в развитие сердечной-сосудистых патологий. Тер. арх., 1999, т. 71, №9, с. 8–12.
16. Шуклин А.В., Реутов В.П. и Охотин В.Е. Регуляторная роль оксида азота и значение NO-синтаз в миокарде: молекулярные и цитофизиологические аспекты. В кн.: Сб. трудов I съезда физиологов СНГ (19–23 сентября 2005 г., Сочи, Дагомыс). М., Медицина, Здоровье, 2005, т. 2, с. 11.
17. Arstall M.A., Sawyer D.B., Fukazawa R. and Kelly R.A. Cytokine-mediated apoptosis in cardiac myocytes: the role of inducible nitric oxide synthase induction and peroxynitrite generation. Circ. Res., 1999, v. 85, №9, p. 829–840.
18. Ashley E.A., Sears C.E., Bryant S.M. et al. Cardiac nitric oxide synthase 1 regulates basal and beta-adrenergic contractility in murine ventricular myocytes. Circulation, 2002, v. 105, №25, p. 3011–3016.
19. Balligand J.L., Kelly R.A., Marsden P.A. et al. Control of cardiac muscle cell function by an endogenous nitric oxide signaling system. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 1993, v. 90, №1, p. 347–351.
20. Balligand J.L., Kobzik L., Han X. et al. Nitric oxide-dependent parasympathetic signaling is due to activation of constitutive endothelial (type III) nitric oxide synthase in cardiac myocytes. J. Biol. Chem., 1995, v. 270, №24, p. 14582–14586.
21. Barouch L.A., Harrison R.W., Skaf M.W. et al. Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms. Nature, 2002, v. 416, №6878, p. 337–339.
22. Bassani J.W., Bassani R.A. and Bers D.M. Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species dependent differences in cellular mechanisms. J. Physiol. 1994, v. 476, p. 279–293.
23. Bates T.E., Loesch A., Burnstock G. and Clark J.B. Mitochondrial nitric oxide synthase: A ubiquitous regulator of oxidative phosphorylation? Biochem. Biophys. Res. Comm., 1996, v. 218, p. 40–44.
24. Belevych A.E. and Harvey R.D. Muscarinic inhibitory and stimulatory regulation of the L-type Ca^{2+} current is not altered in cardiac ventricular myocytes from mice lacking endothelial nitric oxide synthase. J. Physiol., 2000, v. 528, p. 279–289.
25. Bers D.M. Cardiac excitation-contraction coupling. Nature, 2002, v. 415, p. 198–205.
26. Bloch W., Addicks K., Hescheler J. and Fleischmann B.K. Nitric oxide synthase expression and function in embryonic and adult cardiomyocytes. Microsc. Res. Tech., 2001, v. 55, №4, p. 259–269.
27. Bloch W., Fan Y., Han J. et al. Disruption of cytoskeletal integrity impairs Gi-mediated signaling due to displacement of Gi proteins. J. Cell. Biol., 2001, v. 154, №4, p. 753–761.
28. Brini M. Ryanodine receptor defects in muscle genetic diseases. Biochem. Biophys. Res. Commun., 2004, v. 322, p. 1245–1255.
29. Champion H.C., Georgakopoulos D., Takimoto E. et al. Modulation of in vivo cardiac function by myocyte-specific nitric oxide synthase-3. Circ. Res., 2004, v. 94, №5, p. 657–663.
30. Champion H.C., Skaf M.W. and Hare J.M. Role of nitric oxide in the pathophysiology of heart failure. Heart Fail Rev., 2003, v. 8, №1, p. 35–46.
31. Cohen R.A. The role of nitric oxide and other endothelium-derived vasoactive substances in vascular disease. Prog. Cardiovasc. Dis., 1995, v. 38, p. 105–128.
32. Damy T., Ratajczak P., Shah A.M. et al. Increased neuronal nitric oxide synthase-derived NO production in the failing human heart. Lancet, 2004, v. 363, №9418, p. 1365–1367.
33. Danson E.J., Zhang Y.H., Sears C.E. et al. Disruption of inhibitory G-proteins mediates a reduction in atrial beta-adrenergic signaling by enhancing eNOS expression Danson: Augmented eNOS signaling in atrial myocytes. Cardiovasc. Res., 2005, v. 67, №4, p. 613–23;.
34. Fabiato A. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. Am. J. Physiol., 1983, v. 245, p. C1–C14.
35. Ferdinandy P., Panas D. and Schulz R. Peroxynitrite contributes to spontaneous loss of cardiac efficiency in isolated working rat hearts. Am. J. Physiol., 1999, v. 276, p. H1861–H1867.
36. Feron O., Belhassen L., Kobzik L. et al. Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. J. Biol. Chem., 1996, v. 271, №37, p. 22810–22814.
37. Feron O., Han X. and Kelly R.A. Muscarinic cholinergic signaling in cardiac myocytes: dynamic targeting of M2AChR to sarcolemmal caveolae and eNOS activation. Life Sci., 1999, v. 64, № 6–7, p. 471–477.
38. Fill M., Zahradnikova A., Villalba-Galea C.A. et al. Ryanodine receptor adaptation. J. Gen. Physiol., 2000, v. 116, №6, p. 873–882.
39. Forstermann U., Boissel J.P. and Kleinert H. Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). FASEB J., 1998, v. 12, №10, p. 773–790.
40. Fukuchi M., Hussain S.N.A. and Giaid A. Heterogeneous expression and activity of endothelial and inducible nitric oxide synthases in end-stage human heart failure. Their relation to lesion site and b-adrenergic receptor therapy. Circulation, 1998, v. 98, p. 132–139.
41. Gallo M.P., Malan D., Bedendi I. et al. Regulation of cardiac calcium current by NO and cGMP-modulating agents. Pflugers Arch., 2001, v. 441, №5, p. 621–628.
42. Godecke A., Molojavyi A., Heger J. et al. Myoglobin protects the heart from inducible nitric-oxide synthase (iNOS)-mediated nitrosative stress. J. Biol. Chem., 2003, v. 278, p. 21761–21766.
43. Godecke A. and Schrader J. The Janus faces of NO? Circ. Res., 2004, v. 94, №6, p. e55.
44. Gratton J.P., Bernatchez P. and Sessa W.C. Caveolae and caveolins in the cardiovascular system. Circ. Res., 2004, v. 94, p. 1408.

45. Han X., Kobzik L., Severson D. and Shimoni Y. Characteristics of nitric oxide-mediated cholinergic modulation of calcium current in rabbit sino-atrial node. *J. Physiol.*, 1998, v. 509, p. 741–754.
46. Han X., Shimoni Y. and Giles W.R. An obligatory role for nitric oxide in autonomic control of mammalian heart rate. *J. Physiol.*, 1994, v. 476, p. 309–314.
47. Hare J.M. Oxidative stress and apoptosis in heart failure progression. *Circ. Res.*, 2001, v. 89, №3, p. 198–200.
48. Hare J.M. Nitric oxide and excitation-contraction coupling. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2003, v. 35, №7, p. 719–729.
49. Hare J.M. Spatial confinement of isoforms of cardiac nitric-oxide synthase: unravelling the complexities of nitric oxide's cardiobiology. *Lancet*, 2004, v. 363, №9418, p. 1338–1339.
50. Hare J.M., Kim B., Flavahan N.A. et al. Pertussis toxin-sensitive G proteins influence nitric oxide synthase III activity and protein levels in rat heart. *J. Clin. Invest.*, 1998, v. 101, №6, p. 1424–1431.
51. Hare J.M., Lofthouse R.A., Juang G.J. et al. Contribution of caveolin protein abundance to augmented nitric oxide signaling in conscious dogs with pacing-induced heart failure. *Circ. Res.*, 2000, v. 86, № 10, p. 1085–1092.
52. Hare J.M. and Stamler J.S. NOS: modulator, not mediator of cardiac performance. *Nat. Med.*, 1999, v. 5, №3, p. 273–274.
53. Hassall C.J., Saffrey M.J., Belai A. et al. Nitric oxide synthase immunoreactivity and ADPH-diaphorase activity in a subpopulation of intrinsic neurones of the guinea-pig heart. *Neurosci. Lett.*, 1992, v. 143, № 1–2, p. 65–68.
54. Heger J., Godecke A., Flogel U. et al. Cardiac-specific overexpression of inducible nitric oxide synthase does not result in severe cardiac dysfunction. *Circ. Res.*, 2002, v. 90, p. 93–99.
55. Herring N., Danson E.J. and Paterson D.J. Cholinergic control of heart rate by nitric oxide is site specific. *News Physiol. Sci.*, 2002, v. 17, p. 202–206.
56. Herring N., Rigg L., Terrar D.A. and Paterson D.J. NO-cGMP pathway increases the hyperpolarisation-activated current, $I(f)$, and heart rate during adrenergic stimulation. *Cardiovasc. Res.*, 2001, v. 52, p. 446–453.
57. Ignarro L.J., Byrns R.E., Buga G.M. and Wood K.S. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacological and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ. Res.*, 1987, v. 61, p. 866–879.
58. Ji G.J., Fleischmann B.K., Bloch W. et al. Regulation of the L-type Ca^{2+} channel during cardiomyogenesis: switch from NO to adenylyl cyclase-mediated inhibition. *FASEB J.*, 1999, v. 13, № 2, p. 313–324.
59. Kanai A. and Peterson J. Function and regulation of mitochondrially produced nitric oxide in cardiomyocytes. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*, 2004, v. 286, №1, p. H11–H12.
60. Kaye D.M., Wiviott S.D., Balligand J.L. et al. Frequency-dependent activation of a constitutive nitric oxide synthase and regulation of contractile function in adult rat ventricular myocytes. *Circ. Res.*, 1996, v. 78, №2, p. 217–224.
61. Kelly R.A. and Smith T.W. Cytokines and cardiac contractile function. *Circulation*, 1997, v. 95, №4, p. 778–781.
62. Klimaschewski L., Kummer W., Mayer B. et al. Nitric oxide synthase in cardiac nerve fibers and neurons of rat and guinea pig heart. *Circ. Res.*, 1992, v. 71, №6, p. 1533–1537.
63. Levin K.R. and Page E. Quantitative studies on plasmalemmal folds and caveolae of rabbit ventricular myocardial cells. *Circ. Res.*, 1980, v. 46, p. 244–255.
64. Litwin S.E., Zhang D. and Bridge J.H. Dyssynchronous Ca^{2+} sparks in myocytes from infarcted hearts. *Circ. Res.*, 2000, v. 87, p. 1040–1047.
65. Lokuta A.J., Maertz N.A., Meethal S.V. et al. Increased nitration of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase in human heart failure. *Circulation*, 2005, v. 111, №8, p. 988–995.
66. Marletta M.A. Nitric oxide: biosynthesis and biological significance. *Trends Biochem. Sci.*, 1989, v. 14, № 12, p. 488–492.
67. Marletta M.A. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J. Biol. Chem.*, 1993, v. 268, p. 12231–12234.
68. Massion P.B. and Balligand J.L. Modulation of cardiac contraction, relaxation and rate by the endothelial nitric oxide synthase (eNOS): lessons from genetically modified mice. *J. Physiol.*, 2003, v. 546, p. 63–75.
69. Massion P.B., Feron O., Dessy C. and Balligand J.L. Nitric oxide and cardiac function: ten years after, and continuing. *Circ. Res.*, 2003, v. 93, p. 388–398.
70. Michel J.B., Feron O., Sase K. et al. Caveolin versus calmodulin. Counterbalancing allosteric modulators of endothelial nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.*, 1997, v. 272, №41, p. 25907–25912.
71. Mohan R.M., Choate J.K., Golding S. et al. Peripheral pre-synaptic pathway reduces the heart rate response to sympathetic activation following exercise training: role of NO. *Cardiovasc. Res.*, 2000, v. 47, №1, p. 90–98.
72. Moncada S. and Erusalimsky J.D. Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2002, v. 3, p. 214–220.
73. Mungrue I.N., Stewart D.J. and Husain M. The Janus faces of iNOS. *Circ. Res.*, 2003, v. 93, №7, p. e74.
74. Musialek P., Lei M., Brown H.F. et al. Nitric oxide can increase heart rate by stimulating the hyperpolarization-activated inward current, $I(f)$. *Circ. Res.*, 1997, v. 81, p. 60–68.
75. Okhotin V.E. and Goncharuk V.D. Nitric oxide containing and receptor terminals in the rabbit heart. *Medicina*, 1996, v. 4, №32, p. 111–112.
76. Okhotin V.E. and Kupriyanov V.V. Neurovascular relationships in the human neocortex. *Neurosci. Behav. Physiol.*, 1997, v. 27, №5, p. 482–488.
77. Oyama J., Shimokawa H., Momii H. et al. Role of nitric oxide and peroxynitrite in the cytokine-induced sustained myocardial dysfunction in dogs in vivo. *J. Clin. Invest.*, 1998, v. 101, p. 2207–2214.
78. Palmer R.M., Ferrige A.G. and Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 1987, v. 327, № 6122, p. 524–526.
79. Paton J.F., Kasparov S. and Paterson D.J. Nitric oxide and autonomic control of heart rate: a question of specificity. *Trends Neurosci.*, 2002, v. 25, №12, p. 626–631.
80. Petroff M.G., Kim S.H., Pepe S. et al. Endogenous nitric oxide mechanisms mediate the stretch dependence of Ca^{2+} release in cardiomyocytes. *Nat. Cell Biol.*, 2001, v. 3, №10, p. 867–873.
81. Piech A., Dessy C., Havaux X. et al. Differential regulation of nitric oxide synthase and their allosteric regulators in heart and vessels of hypertensive rats. *Cardiovasc. Res.*, 2003, v. 57, №2, p. 456–467.

82. Piech A., Massart P.E., Dessy C. et al. Decreased expression of myocardial eNOS and caveolin in dogs with hypertrophic cardiomyopathy. *Am. J. Physiol.*, 2002, v. 282, p. H219–231.
83. Richardson R.J., Grkovic I. and Anderson C.R. Immunohistochemical analysis of intracardiac ganglia of the rat heart. *Cell Tissue Res.*, 2003, v. 314, p. 337–350.
84. Sah R., Ramirez R.J. and Backx P.H. Modulation of Ca^{2+} release in cardiac myocytes by changes in repolarization rate: role of phase-1 action potential repolarization in excitation-contraction coupling. *Circ. Res.*, 2002, v. 90, p. 165–173.
85. Saito T., Hu F., Tayara L. et al. Inhibition of NOS II prevents cardiac dysfunction in myocardial infarction and congestive heart failure. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*, 2002, v. 283, №1, p. H339–H345.
86. Schroder F., Klein G., Fiedler B. et al. Single L-type Ca^{2+} channel regulation by cGMP-dependent protein kinase type I in adult cardiomyocytes from PKC I transgenic mice. *Cardiovasc. Res.*, 2003, v. 60, №2, p. 268–277.
87. Schulz R., Nava E. and Moncada S. Induction and potential biological relevance of a Ca^{2+} -independent nitric oxide synthase in the myocardium. *Br. J. Pharmacol.*, 1992, v. 105, p. 575–580.
88. Sears C.E., Bryant S.M., Ashley E.A. et al. Cardiac neuronal nitric oxide synthase isoform regulates myocardial contraction and calcium handling. *Circ. Res.*, 2003, v. 92, №5, p. e52–e59.
89. Sears C.E., Choate J.K. and Paterson D.J. Inhibition of nitric oxide synthase slows heart rate recovery from cholinergic activation. *J. Appl. Physiol.*, 1998, v. 84, №5, p. 1596–1603.
90. Simons K. and Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2000, №1, p. 31–39.
91. Sitsapesan R. and Williams A.J. Do inactivation mechanisms rather than adaptation hold the key to understanding ryanodine receptor channel gating? *J. Gen. Physiol.*, 2000, v. 116, №6, p. 867–872.
92. Sjaastad I., Wasserstrom J.A. and Sejersted O.M. Heart failure — a challenge to our current concepts of excitation-contraction coupling. *J. Physiol.*, 2003, v. 546, p. 33–47.
94. Snyder S.H. and Brett D.S. Nitric oxide as a neuronal messenger. *Trends Pharmacol. Sci.*, 1991, v. 12, № 4, p. 125–128.
93. Snyder S.H. Janus faces of nitric oxide. *Nature*, 1993, v. 364, №6438, p. 577.
95. Sosunov A.A., Hassall C.J., Loesch A. et al. Nitric oxide synthase-containing neurones and nerve fibres within cardiac ganglia of rat and guinea-pig: an electron-microscopic immunocytochemical study. *Cell Tissue Res.*, 1996, v. 284, №1, p. 19–28.
96. Tanaka K., Hassall C.J. and Burnstock G. Distribution of intracardiac neurones and nerve terminals that contain a marker for nitric oxide, NADPH-diaphorase, in the guinea-pig heart. *Cell Tissue Res.*, 1993, v. 273, №2, p. 293–300.
97. Torre-Amione G., Kapadia S., Benedict C. et al. Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: A report from the studies of left ventricular dysfunction (SOLVD). *J. Am. Coll. Cardiol.*, 1996, v. 27, №5, p. 1201–1206.
98. Ungureanu-Longrois D., Balligand J.L., Kelly R.A. and Smith T.W. Myocardial contractile dysfunction in the systemic inflammatory response syndrome: role of a cytokine-inducible nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *J. Mol. Cell Cardiol.*, 1995, v. 27, №1, p. 155–167.
99. Vandecasteele G., Verde I., Rucker-Martin C. et al. Cyclic GMP regulation of the L-type Ca^{2+} channel current in human atrial myocytes. *J. Physiol.*, 2001, v. 533, p. 329–340.
100. Vanin A.F., Malenkova I.V. and Serezhnikov V.A. Iron catalyzes both decomposition and synthesis of S-nitrosothiols: optical and electron paramagnetic resonance studies. *Nitric Oxide*, 1997, v. 1, № 3, p. 191–203.
101. Willmott N., Sethi J.K., Walseth T.F. et al. Nitric oxide-induced mobilization of intracellular calcium via the cyclic ADP-ribose signaling pathway. *J. Biol. Chem.*, 1996, v. 271, p. 3699–3705.
102. Xu K.Y., Huso D.L., Dawson T.M. et al. Nitric oxide synthase in cardiac sarcoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, v. 96, №2, p. 657–662.
103. Xu L., Eu J.P., Meissner G. and Stamler J.S. Activation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation. *Science*, 1998, v. 279, №5348, p. 234–237.
104. Yano M., Ikeda Y. and Matsuzaki M. Altered intracellular Ca^{2+} handling in heart failure. *J. Clin. Invest.*, 2005, v. 115, №3, p. 556–564.

Поступила в редакцию 10.10.2005 г.

SIGNIFICANCE OF NEURONAL, ENDOTHELIAL AND INDUCIBLE NO-SYNTHASE ISOFORMS IN CARDIAC MUSCLE HISTOPHYSIOLOGY

V.E. Okhotin and A.V. Shuklin

This review summarizes the information on the interrelations between intracellular localization of NO-synthases (NOS) and their regulatory functions within different compartments of a cardiomyocyte in the light of general conception of Barouch et al. (2002) on the intracellular «spatial compartmentalization» of NOS isoforms. Participation of NO in cardiomyocyte function control is based on complex spatial compartmentalization of NOS isoforms: neuronal (NOS1), inducible (NOS2) and endothelial (NOS3), which possess unequal activities resulting in hundredfold differences in the concentrations of gas produced. Regulatory role of constitutive Ca-dependent NOS1 and NOS3 is associated with production of low NO concentrations, which cause a decline in cardiomyocyte contractility and a reduction in heart rate. Conversely, Ca-independent inducible NOS2 appears only in the damaged myocardium with a compromised contractile function. NOS2 produces high unregulated NO concentrations, which are connected with the generation of peroxynitrites and NO cytotoxic action. NOS3 is associated with the membranes of cardiomyocyte caveoli and T-tubules, while NOS1 is localized on the sarcoplasmic reticulum membranes. NOS isoform compartmentalization promotes regulation of different circuits in NO-signaling pathways in myocardium, and this principle is a key for understanding of contradictions existing in NO biology in the heart. Changes in NOS subcellular compartmentalization lead to the increased NO synthesis, reduction of the specificity of its effects, disruption of calcium cycle mechanisms, electromechanical uncoupling and myocardial contractility failure. The mechanisms of selective effects of different NO-ergic regulatory pathways on the activity of five major targets in pacemaker and working cardiomyocytes, are discussed.

Key words: NOS1, NOS2, NOS3, cardiomyocytes, subcellular compartmentalization.

Laboratory of Neuromorphology with the Electron Microscopy Group, Russian Cardiology Scientific Complex and Laboratory of Neurogenetics and Developmental Genetics, RAS Institute of Gene, Moscow.