

**Конечные продукты метаболизма оксида азота
при искусственном гипометаболизме у крыс и хомяков**

А.В. ШИЛО¹, В.В. ЛОМАКО¹, Т.Н. БОНДАРЬ², Г.А. БАБИЙЧУК¹

¹Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

²Институт терапии им. Л.Т. Малой АМН Украины, г. Харьков

**Nitric Oxide Derivatives at Artificial
Hypometabolism in Rats and Hamsters**

A.V. SHILO¹, V.V. LOMAKO¹, T.N. BONDAR², G.A. BABIYCHUK¹

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy
of Sciences of the Ukraine, Kharkov

²Institute of Therapy named after L.T. Malaya of the Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kharkov

Изучали реакцию системы, ответственной за генерацию NO, на комбинацию факторов, создающих условия для развития природного гипометаболизма (гипоксия, гиперкапния, темнота и низкая температура) у животного, способного впадать в зимнюю спячку (хомяк) по сравнению с животным (крыса), у которого такая способность отсутствует. Сочетанное действие нарастающей гипоксии и гиперкапнии на фоне охлаждения, по-видимому, затрагивая одни и те же L-аргининовые NO-пути, не приводит к серьезным нарушениям обмена NO у гибернирующих и негибернирующих животных. Отмеченные изменения носят, очевидно, адаптивный характер, в основном нивелируются уже через 2 ч и окончательно – через 24 ч после возвращения животных в нормальные условия. Исключение составляет сниженный уровень нитрита в крови у животных, способных к гибернации.

Ключевые слова: оксид азота, гипометаболизм, охлаждение, гипоксия, гиперкапния.

Вивчали реакцію системи, що відповідає за генерацію NO, на комбінацію факторів, які сприяють розвитку природного гіпометаболізму (гіпоксія, гіперкапнія, темрява і низька температура) у тварини, здатної впадати в зимову сплячку (хом'як) у порівнянні з твариною (щур), у якої така здатність відсутня. Поєднана дія наростаючої гіпоксії і гіперкапнії на фоні охолодження, очевидно, реалізуються через ті ж самі L-аргінінові NO-шляхи, не приводить до серйозних порушень обміну NO у тварин, що гібернують і не гібернують. Відзначені зміни носять, мабуть, адаптивний характер, в основному нівелюються вже через 2 год і остаточно – через 24 год після повернення тварин у нормальні умови. Виключення складає знижений рівень нітриту в крові у тварин, здатних до гібернації.

Ключові слова: оксид азоту, гіпометаболізм, охолодження, гіпоксія, гіперкапнія.

The response of NO generated system of hibernator (hamster) and non-hibernator (rat) to the combination of factors (hypoxia, hypercapnia, low temperature and darkness) that promotes the development of natural hypometabolism has been studied. The combined action of increasing hypoxia and hypercapnia at the background of cooling is thought to affect the same L-arginine-NO-ways, but it does not lead to serious disturbance of NO metabolism in hibernators and non-hibernators. All discovered changes were likely adaptive and in general have been restored in 2 h and leveled in 24 h after animals arousal from the artificial hypometabolic state. The only exception is the depressed level of NOx content in hamster blood.

Key-words: nitric oxide, hypometabolism, low temperature, hypoxia, hypercapnia.

Открытие нового биологического регулятора – оксида азота (NO) – способствовало развитию особого направления в регуляции клеточных функций и коммуникаций. Эта простая, но высокоэффективная молекула, первоначально открытая как фактор расслабления сосудов, впоследствии была идентифицирована как нейротрансмиттер в центральной и периферической нервной системе, участник ряда важных биологических функций: экспрессии генов, контроля высвобождения нейромедиаторов, регуляции тонуса мозговых сосудов, проницаемости гематоэнцефалического барьера, процессов обучения и памяти [11, 34], многих периферических процессов, реализации

Discovery of nitric oxide (NO), the novel biological regulator contributed the development of a special trend in regulating the cell functions and communications. This simple but highly effective molecule, discovered initially as endothelium relaxation factor, was then identified as a neurotransmitter in central and peripheral nervous system, participant of a number of important biological functions: gene expression, control of neuromediators release, tonus regulation in brain vessels, blood-brain barrier permeability, learning and memory processes [24, 37].

NO has been recently shown to possess an important role in the mechanisms for temperature homeostasis maintenance [18], as well as a hypoxia

Адрес для корреспонденции: Шило А.В., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 772-29-35, факс: +38 (057) 772-00-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Address for correspondence: Shilo A.V., Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +38 (057) 7722935, fax: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

иммунного ответа организма, а также развитию ряда патологических состояний [24, 37].

Недавно было показано [18], что NO играет значительную роль в механизмах поддержания температурного гомеостаза, а также влияния гипоксии на метаболизм, температуру тела и дыхание теплокровного организма [17]. Предполагается, что гипоксия за счет понижения уровня NO в мозге ведет к смещению установочной точки (set point) температурного гомеостаза. Данное утверждение согласуется с тем фактом, что развивающаяся гипоксия сама по себе и при одновременном действии холода ведет к падению температуры тела, возможно, также связанному со смещением установочной точки температурного гомеостаза [3], сдвиг которой рассматривают как предпосылку для развития гипометаболизма, в частности природного [19].

Тем не менее, точные механизмы, с помощью которых NO влияет на метаболизм и терморегуляцию в нормальных условиях и при развитии гипометаболизма, еще не выяснены.

В связи с этим интересно было не только изучить реакцию системы, ответственной за генерацию NO, но и выявить особенности ответной реакции организма, способного впадать в зимнюю спячку (хомяк), на комбинацию факторов, создающих условия для развития природного гипометаболизма (гипоксия, гиперкапния, темнота и низкая температура), по сравнению с организмом животного (крыса), у которого такая способность отсутствует. Следует отметить, что золотистый хомячок относится к млекопитающим с так называемой факультативной способностью впадать в зимнюю спячку, отличается еще и высокой устойчивостью к воздействию низких температур.

Цель работы – изучение содержания конечного продукта обмена NO (нитрита) в ЦНС и периферических органах гибернирующих (хомяк) и негибернирующих (крыса) животных при развитии искусственного гипометаболического состояния (ИГМС) и выходе из него.

Материалы и методы

Эксперименты проведены на 7-8-месячных крысах-самцах линии Вистар массой 180-200 г и 5-6-месячных золотистых хомяках-самцах (*Mesocricetus auratus*) массой 85-95 г в зимний период. Животных содержали в условиях вивария, они получали стандартный рацион с добавлением зерен пшеницы и семян подсолнечника. Гипометаболическое состояние вызывали по методу Анджуса-Бахметьева-Джайя [2]: животных в герметично закрытом сосуде (объемом 3 дм³ для крыс и 2 дм³ для хомяков) помещали на 3 ч в

effect on metabolism, body temperature and respiration of endothermal organism [17]. Hypoxia is thought to result in a set point shift due to NO level fall in brain. The idea is consistent with the well known fact, that the developing hypoxia itself and being combined with cold effect causes the body temperature fall, which might also be associated with the set point shift of temperature homeostasis [3], which is also thought to be the pre-condition for hypometabolism development, and particularly, a natural one [19].

Nevertheless the exact mechanisms by those NO influences the metabolism and thermoregulation under normal conditions and at hypometabolism development, still remain unclear.

In this concern it was of interest not only to study the system response responsible for NO generation, but also to reveal possible peculiarities of an organism response, which is capable of hibernating (hamster) to the combination of factors providing the conditions for natural hypometabolism development (hypoxia, hypercapnia, darkness and low temperature) comparing to the animals (rats) in which such a capability is absent. It should be noted that golden hamster is related to the mammals with a so-called optional capability to hibernation and is also characterized by high resistance to low temperature effect.

Present work therefore studies the derivatives content of NO metabolism, nitrite, in CNS and peripheric hibernating organs (hamsters) and non-hibernating ones (rats) during an artificial hypometabolism (AHMS) development and on leaving this state.

Materials and methods

Experiments were performed in winter in 7-8 months' Wistar male rats with the weight of 180-200g and 85-95g 5-6 months' male golden hamsters (*Mesocricetus auratus*). Animals were kept in vivarium with a standard feeding with wheat corns and sunflower seeds added. Hypometabolic state was induced using the method of Andjus-Bakhmetyev-Giaja [2]: animals in a hermetically sealed tank (3dm³ volume for rats and 2dm³ for hamsters) were placed for 3 hours into a dark cold chamber (3-5°C). Under the effect of developing hypoxia, hypercapnia and low temperature conditions AHMS was noted to develop.

Experiments were accomplished in compliance with "Ethical Principles and Guidelines for Scientific Experiments on animals", approved by the 1st National Bioethics Congress (Kiev, Ukraine, 2001) and brought into accord with the "European Convention on Vertebrate Protection, Used for Experimental and other Scientific Aims" (Strasbourg, France, 1985).

темную холодовую камеру (3-5°C). Под влиянием нарастающей гипоксии, гиперкапнии и в условиях низкой температуры среды у животных развивалось ИГМС.

Эксперименты проведены в соответствии с “Общими этическими принципами экспериментов на животных”, одобренными I Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, Украина, 2001) и согласованными с положениями “Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей” (Страсбург, Франция, 1985).

Животные были разбиты на 4 группы: 1 – контроль; 2 – ИГМС (через 3 ч пребывания в герметичной камере на холоде); 3 – через 2 ч после ИГМС; 4 – через 24 ч после ИГМС. Забой животных осуществляли путем декапитации.

В сыворотке крови, тканях мозга (кора, гипоталамус, ствол, мозжечок), легких, сердца, печени и почек оценивали уровень NO по содержанию нитрита (конечного продукта обмена NO) фотометрическим методом по реакции Грисса. Образцы тканей гомогенизировали в Na-фосфатном буфере, pH 7,4 при температуре 4-6°C, депротенизировали 75 ммоль/л ZnSO₄ и 55 ммоль/л NaOH в соотношении 1:1:1,2 по объему соответственно, центрифугировали 15 мин при 3000 об/мин на центрифуге PC-6; к 200 мкл супернатанта последовательно добавляли 20 мкл 1%-го сульфонида и 20 мкл 0,1%-го N-1-нафтилэтилендиаминдигидрохлорида в 5%-м HCl [1]. Оптическую плотность определяли через 20 мин при 540 нм с помощью многоканального микроспектрофотометра фирмы “Flow” (Великобритания). При проведении исследования использовали N-(1-нафтил)-этилендиаминдигидрохлорид, сульфонида фирмы ICN (США), остальные реагенты – отечественного производства.

Статистическую обработку данных проводили методом однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA).

Результаты и обсуждение

Наиболее достоверным и точным методом определения содержания NO на сегодняшний день считается прямой метод измерения концентрации свободного NO с помощью NO-селективных электродов, но так как NO является газом с очень коротким временем жизни (несколько секунд) и высокой реакционной способностью, используются различные варианты измерения его стабильных метаболитов – нитрата и нитрита. Однако определяемый уровень нитрита зависит не только от активности специфических синтаз, но и от их распределения в различных органах и тканях, а также от скорости выведения нитрита почками.

Animals of each species were divided into 4 groups: 1 control, 2 AHMS (3 hours of being kept in a sealed chamber in ice), group 3 (2 hrs after AHMS), group 4 (24hrs after AHMS). Animals were decapitated.

In blood serum, brain tissue (cortex, hypothalamus, stem, cerebellum), lungs, heart, liver and kidneys the NO level was evaluated using Griss reaction-based method. Tissue samples were homogenized in Na-phosphate buffer, pH 7.4 under the temperature of 4-6°C, 75 mmol/l ZnSO₄ and 55 mmol/l NaOH were deproteinized in 1:1:1.2 ratio correspondingly by volume, 15min centrifuged at 3000 rot/min using PC-6 centrifuge; to 200µl of supernatant there were then gradually added 20 µl of 1% sulfonamide and 20µl of 0.1% N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride in 5% HCl [1]. Optical density was evaluated 20 min later at 540 nm using multi-channel, microspectrophotometer (“Flow”, UK). During the investigation there was used N(1-naphthyl)-ethylendiamine dihydrochloride, sulfonamide (ICN production, USA), the other reagents were of the Ukrainian production.

Statistical processing of the data was accomplished using a one-way analysis of variance (ANOVA).

Results and discussion

Among the methods used for NO content determination the direct method for free NO concentration measuring by NO-selective electrodes is considered as the most significant and precise one, although as NO is the gas with quite a short half-life (several seconds) and a high reactive ability, various methods for measuring its stable metabolites (nitrate and nitrite, NOx) are widely used. However the NOx level to determine depends not only on the activity of specific synthases, but on their distribution in different organs and tissue, as well as on the rate of nitrite elimination by kidneys. Nevertheless the estimation of derivatives concentration of NOx metabolism is thought to be the most acceptable mark for total NO production level [35].

Our experiments in non-hibernators showed in norm nitrite concentration in rats was in general a little higher in CNS comparing to peripheric organs and made $7.02 \pm 0.31 \mu\text{mol/l}$ and $6.3 \pm 0.3 \mu\text{mol/l}$ ($p < 0.01$), correspondingly. When the animals reached AHMS (body temperature of $16.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$) there was observed a significant nitrite level rise in brain cortex and the fall in brain stem, liver, kidneys. In other samples studied no considerable changes were found (Fig. 1), though the tendency to nitrite concentration rise was noted in hypothalamus and cerebellum.

After leaving AHMS (in 2 hours, body temperature of $33.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$), there follows the nitrite level rise in brain cortex, recovery up to the control level in brain

Тем не менее оценка концентрации конечных продуктов обмена NO рассматривается как наиболее приемлемая оценка общего уровня продукции NO [35].

Эксперименты на животных, не способных к зимней спячке (крысы), показали, что в норме концентрация нитрита в среднем была несколько выше в ЦНС по сравнению с периферическими органами и составила $7,02 \pm 0,31$ мкмоль/л и $6,3 \pm 0,3$ мкмоль/л ($p < 0,01$) соответственно. При достижении животными ИГМС (температура тела $16,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$) наблюдали его повышение в коре мозга и снижение в стволе мозга, печени и почках. В остальных изученных образцах изменения не обнаружены (рис.1), хотя тенденция к повышению концентрации нитрита отмечается в гипоталамусе и мозжечке.

После выхода из ИГМС (через 2 ч, температура тела $33,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$) происходят дальнейший рост уровня нитрита в коре мозга, восстановление до контрольного уровня в стволе мозга, почках, печени и сердце, падение ниже контрольного уровня в сыворотке крови. В остальных структурах мозга и периферических органах достоверных изменений не наблюдали. Через 24 ч после ИГМС уровень нитрита не отличался от исходных значений во всех образцах.

Исходный уровень нитрита у животных, способных впасть в зимнюю спячку (хомяков), также характеризовался относительно равномерным распределением по структурам мозга и периферическим органам с незначительным преобладанием в ЦНС ($3,25 \pm 0,5$ мкмоль/л против $2,86 \pm 0,2$ мкмоль/л, $p < 0,04$). Однако погружение в ИГМС у хомяков по сравнению с крысами не вызывало изменений концентрации нитрита во всех изученных образцах. Исключение составил лишь сниженный уровень нитрита в легких и сыворотке крови (рис. 2).

В отличие от крыс хомяки начинают разогреваться сразу же после возвращения в нормальные условия среды, что, вероятно, свидетельствует о сохранении активности системы терморегуляции. Через 2 ч после ИГМС уровень нитритов в сыворотке крови и легких возвращался к исходным значениям, при этом в остальных тканях его концентрация не отличалась от контрольных величин.

Через 24 ч отмечалось некоторое снижение нитрита во всех изученных образцах (различия не

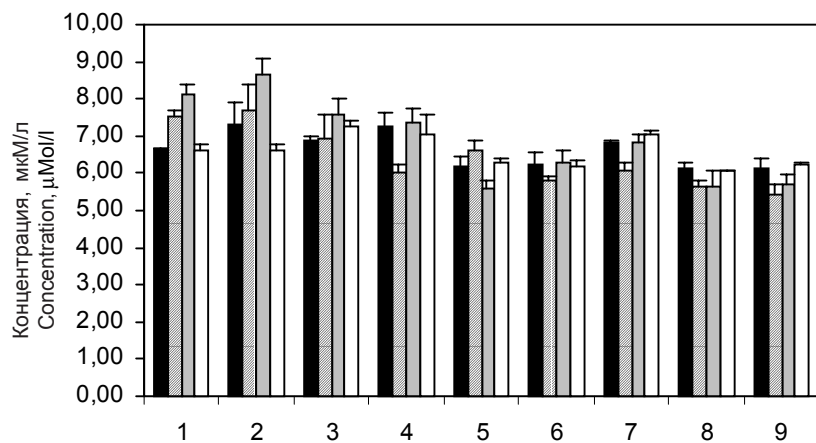


Рис.1. Содержание конечных продуктов обмена NO в структурах мозга и периферических органах у крыс. 1 – кора мозга; 2 – гипоталамус; 3 – мозжечок; 4 – ствол мозга; 5 – сыворотка крови; 6 – легкие; 7 – сердце; 8 – печень, 9 – почки. ■ – контроль; ▨ – ИГМС; ▩ – через 2 ч после ИГМС; □ – через 24 ч после ИГМС.

Fig.1. NO derivatives level in brain structures and peripheral organs in rats. 1 – brain cortex, 2 – hypothalamus, 3 – cerebellum, 4 – brain stem, 5 – blood serum, 6 – lungs, 7 – heart, 8 – liver, 9 – kidneys. ■ – control; ▨ – AHMS; ▩ – 2 hrs after AHMS; □ – 24 hrs after AHMS.

stem, kidneys, liver and heart, and the decrease lower than the control level in blood serum. No significant changes were observed in the other brain structures and peripheral organs.

In 24 hours after AHMS the nitrite level did not differ on the initial values in all the samples.

Nitrite initial level in the animals capable of hibernating (hamsters) was characterized by a relatively even distribution along brain structures and peripheral organs with a slight domination in CNS (3.25 ± 0.5 μmol/l versus 2.86 ± 0.2 μmol/l, $p < 0.04$). Comparing to rats, however, entering AHMS in hamsters did not cause significant nitrite concentration variations in all the samples studied. The only exception made nitrite level in lungs and blood serum (Fig. 2).

Hamsters in contrast to rats started warming up immediately after returning to normal environment conditions, that is thought to be the proof that thermoregulation system remained active. In two hours after AHMS nitrite level in blood serum and lungs returned to the initial values, while in other tissues it showed no significant difference comparing to the control values.

Twenty four hours later there was noted a slight nitrite decrease in all the samples studied (differences are not significant versus control), except blood serum, where the fall was statistically significant.

Thus AHMS in rats and hamsters was shown not to cause irreversible changes in NO homeostasis-responsible system. Presented data demonstrate AHMS slightly impairs the metabolic balance between NO synthesis and breakdown. All the described above changes are of a reversible character, stable tendency to normalization and nearly all return to the base line

достоверны по отношению к контролю), за исключением сыворотки крови.

Таким образом, ИГМС у крыс и хомяков не вызывает необратимых изменений в системе, ответственной за гомеостаз NO. Из приведенных данных видно, что ИГМС незначительно нарушает метаболический баланс между продукцией и разрушением NO. Все вышеописанные изменения носят обратимый характер, имеют устойчивую тенденцию к нормализации, и в основном, нивелируются через 24 ч после воздействия, за исключением сыворотки крови у хомяков.

Основываясь только на анализе изменений концентрации конечных продуктов обмена NO без использования специфических блокаторов различных форм NO-синтаз (NOS) и определения уровня их синтеза, невозможно описать детальные механизмы регулирования обмена NO и участия NOS в реализации ответа организма на комбинированное действие гипоксии, гиперкапнии и холода. Однако можно предположить, что этот процесс в той или иной степени затрагивает все звенья регуляции обмена NO.

В настоящее время известно, что NO в организме образуется из аминокислоты L-аргинина под действием стереоспецифических ферментов (NOS) путем присоединения молекулярного кислорода к концевому атому азота в гуанидиновой группе и метаболизируется в нитраты, нитриты или пероксинитрит [36]. NO-синтазы бывают нейрональные (nNOS или bNOS, NOS-I), макрофагальные (iNOS или mNOS, NOS-II) и эндотелиальные (eNOS или NOS-III) [16]. Каждая из NOS подразделяется на два подтипа – конститутивный и индуцибельный, за исключением mNOS, которая бывает только индуцибельной. Конститутивные NOS (cNOS), функционально связанные с плазматической мембраной, экспрессированы постоянно и обеспечивают базальное освобождение NO. Активность этих ферментов может изменяться под воздействием стресса [36], гипоксии [10], гемодинамического стресса сдвига [15] и др. Индуцибельная NOS (iNOS) экспрессируется под влиянием цитокинов и бактериальных липополисахаридов, на что требуется 4-6 ч. Она образует и обеспечивает длительное выделение большого количества NO активированными макрофагами, нейтрофилами, сосудистым эндотелием, микроглиальными клетками, астроцитами [26]. Считается, что именно iNOS и образующийся под ее

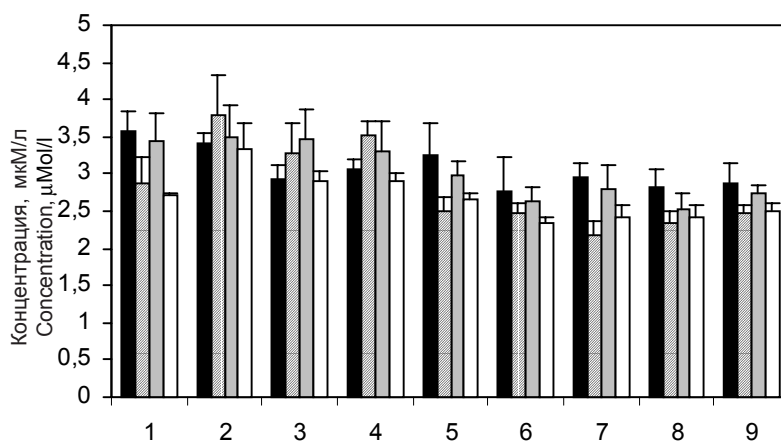


Рис.2. Содержание конечных продуктов обмена NO в структурах мозга и периферических органах у хомяков: 1 – кора мозга; 2 – гипоталамус; 3 – мозжечок; 4 – ствол мозга; 5 – сыворотка крови; 6 – легкие; 7 – сердце; 8 – печень; 9 – почки. ■ – контроль; ▨ – ИГМС; ▩ – через 2 ч после ИГМС; □ – через 24 ч после ИГМС.

Fig. 2. NO derivatives level in brain structures and peripheric organs in hamsters. 1 – brain corte; 2 – hypothalamus; 3 – cerebellum; 4 – brain stem; 5 – blood serum; 6 – lungs; 7 – heart; 8 – liver; 9 – kidneys. ■ – control; ▨ – AHMS; ▩ – 2 hours after AHMS; □ – 24hrs after AHMS.

24 hours after the effect except blood serum in hamsters.

Basing only on the analysis of concentration changes for NO derivatives without using the specific blockers of various NO-synthase (NOS) forms and not determining their synthesis level, it is impossible to describe the detailed mechanisms of NO-metabolism regulation and NOS participation in an organism response realization to hypoxia, hypercapnia and cold combined effect. We may conclude however that this process is relevant in a certain extent to all the regulation links of NO metabolism.

Nowadays NO is known to form of L-arginine amino acid in an organism under the effect of NOS-stereospecific enzymes by attaching molecular oxygen to the nitrogen atom in a guanidine group and to be metabolized in nitrates, nitrites either peroxyinitrite [36]. There are neuronal NOS (nNOS or bNOS, NOS-I), macrophagal (iNOS or mNOS, NOS-II) and endothelial ones (eNOS or NOS-III) [16]. Each of NOS is subdivided into two subtypes: constitutive and inducible, except mNOS, which can be inducible only. Constitutive NOS (cNOS) which are functionally bound to plasma membrane, are constantly expressed and provide basal NO release (pmol). These enzymes' activity may change under stress effect [36], hypoxia, hypodynamic shear stress [15] etc; while the inducible one is expressed under the effect of cytokines and bacterial lipopo-lysacharides, that needs about 4-6 hrs. It forms and provides a long-term release of large (nm) NO amounts by activated macrophages, neutrophiles, vascular endothelium, microglial cells, astrocytes [26]. iNOS itself and NO being formed under its effect are thought to play the main role in suppressing bacterial

влиянием NO играют главную роль в подавлении активности бактериальных и опухолевых клеток путем блокирования некоторых их ферментов, в развитии артериальной гипертензии, нарушении процессов перекисного окисления липидов, развитии и поддержании других патологических процессов, особенно в почках [21]. Однако известно, что уровень экспрессии генов eNOS и nNOS может быть индуцирован рядом стрессовых реакций (гемодинамический стресс сдвига, повреждение нерва и др.) и, наоборот, iNOS может функционировать как конститутивный фермент при физиологических состояниях в некоторых клетках [20].

При этом названия NOS не отражают места их строгой локализации. Так, клетки мозга млекопитающих содержат все три изоформы NOS, иногда расположенные в одних и тех же клетках [11]: например, eNOS широко распространена в нервной системе, где ее активность может быть в ряде случаев даже выше, чем в эндотелиоцитах.

В различных отделах почки также представлены все три изоформы NOS и продуцируемый с их участием NO играет одну из ключевых ролей в ее физиологии [8], являясь важным регулятором почечной гемодинамики и гломерулярной фильтрации, ингибируя транспорт натрия и увеличивая его экскрецию. В сердце также обнаружены все три типа NOS. Оксид азота, выделяемый эндотелиальными клетками сердца, путем повышения внутриклеточной концентрации цГМФ обеспечивает контрактильную функцию миокарда, усиливая релаксацию желудочков, увеличивает диастолическую растяжимость и имеет чрезвычайно важное значение в осуществлении α -адренергического ино- и хронотропного ответов [27].

В эндотелиальных клетках легочной артерии и вены NO образуется под влиянием cNOS. В других клетках легких, способных вырабатывать NO, представлена экспрессия iNOS, в дыхательных путях cNOS характеризуется высокой гомологичностью к iNOS [12].

Характерными реакциями организма животного на погружение в ИГМС, достигаемое по методу Анджуса-Бахметьева-Джайя [2], наряду с эффективным подавлением всех видов химической терморегуляции (как сократительного, так и несократительного термогенеза [5]) и значительным снижением температуры тела, являются падение pH (с 7,4 до 6,8), развитие респираторного ацидоза (pCO_2 повышается в 5-6 раз) и торможение поглощения кислорода тканями (по сравнению с гипотермией до такой же температуры), что может непосредственно влиять на образование NO и, как следствие, нитрита. Так как уменьшение pH приводит к значительному

and tumor cells activity by blocking certain enzymes, in arterial hypertension development, impairment of lipid peroxidation processes, in development and maintenance of other pathological processes, particularly in kidneys [21]. It is known however that the level of gene expression as well as eNOS and nNOS may be induced by a number of stress reactions (hemodynamic shear stress, nerve damage etc) and, in contrast, iNOS may function as a constitutive enzyme at physiological states in some cells [20].

NOS names do not reflect the site of their exact localization thereat. Mammalian brain cells has all three NOS isoforms, located sometimes in the same cells [11]: eNOS, for example, is widely spread in nervous system, where its activity may even be higher in the number of cases, than in endotheliocytes.

In different kidney compartments there are also presented all the three NOS isoforms and NO produced with their participation, plays one of the major roles in its physiology [8] being an important regulator of kidney hemodynamics and glomerular filtration, by inhibiting sodium transport and increasing its excretion.

In heart there were also found all the three NOS types. NO released by endothelial heart cells by increasing an intracellular cGMP concentration provides myocardium contractile function by increasing the relaxation of ventricles, increases diastolic tensility and is indispensable in realization of α -adrenergic ionotropic and chronotropic responses [27].

NO is formed under the effect of eNOS in endothelial cells of lung artery and vein. In many other lung cells capable of producing NO there is presented iNOS expression, in respiratory tracts cNOS is characterized by high homologic characteristics to iNOS [12].

Fall of pH (7.4 to 6.8), respiratory acidosis development (pCO_2 is 5-6 times increased) and inhibition of oxygen adsorption by tissues (comparing to hypothermia up to the same temperature) are known to be peculiar responses of an animal organism to entering into AHMS reached using Andjus-Bakhmetiev-Giaja method [2] along with effective suppression of all types of chemical thermoregulation (both shivering and non-shivering thermogenesis [5]) and considerable body temperature fall, that may directly affect the NO formation and, as a result, nitrite formation. As according to the paper [14] pH fall causes a significant reduction of NOS activity associated with the sensitivity decrease to Ca^{2+} ions from one hand and a tight dependence of the processes of NO synthesis and breakdown upon the presence of oxygen both free and the one bound with hemoglobin, from another hand [32], we may expect a considerable fall in the level of NO derivatives. However the processes of NO metabolism only in brain stem, liver and kidneys in rats and also for hamsters in lungs and

падению активности NOS [14], связанному с понижением чувствительности к ионам Ca^{2+} , с одной стороны, и сильной зависимостью процессов синтеза и распада NO от наличия кислорода как свободного, так и связанного с гемоглобином, с другой [32], можно было бы ожидать значительного снижения уровня конечного продукта обмена NO. Однако зависимыми от вышеперечисленных факторов в наших исследованиях, возможно, являются только процессы обмена NO в стволе мозга, печени и почках у крыс, в легких и сыворотке крови у хомяков. При этом модуляция активности NOS в пределах физиологических pH может представлять важный и быстрый механизм контроля образования NO во время переходов нормоксия-аноксия и обратно [14].

Гипоксия сама по себе приводит к развитию гипометаболизма и гипотермии у многих организмов от простейших до млекопитающих, по крайней мере, частично связанных с NO [10, 17]. Отмеченные при этом увеличение кожного кровотока и повышение температуры кожи, вероятно, регулируются влиянием NO на центры терморегуляции. В то же время при гипоксии, очевидно, происходит снижение температурной set point как следствие уменьшения NO в мозге, что может быть связано с ингибированием активности NOS [30].

Так как NO способствует активной вазодилатации и является одним из основных факторов, регулирующих кровотоки и контролирующих базальное артериальное давление [13], то отмеченный нами повышенный уровень нитрита в коре мозга крыс может отражать централизацию кровообращения, направленного на поддержание кровотока через эту структуру мозга.

Гипоксия подавляет и транскрипцию гена eNOS и стабильность ее мРНК [25], что в совокупности с понижающейся температурой может приводить к падению содержания конечных продуктов обмена NO и свидетельствовать о частичной вазоконстрикции или нарушении эндотелий-зависимой релаксации сосудов.

Однако при пролонгировании гипоксии [29], наоборот, отмечали увеличение экспрессии nNOS и повышение содержания NO. Существует мнение, что увеличение синтеза нейронального NO в ишемизированном мозге усугубляет повреждающее действие гипоксии, тогда как повышение активности эндотелиальной NOS имеет положительное влияние, в первую очередь, за счет активной дилатации сосудов [22]. Следовательно, можно предположить, что в нашем случае именно эндотелиальная NOS в большей степени способствует увеличению конечных продуктов обмена NO в коре мозга у крыс.

blood serum are thought to be dependent upon the mentioned factors, while NOS activity modulation within the limits of physiological pH may represent an important and quick mechanism of NO formation control during the normoxia-anoxia transitions and vice versa [14].

Hypoxia itself results in hypometabolism and hypothermia development in a number of organisms from protozoa to mammals, associated at least partially, with NO [10, 17]. Occurred thereat increase of skin blood flow and skin temperature rise are probably regulated via NO influence on thermoregulation centers. At the same time temperature set point fall at hypoxia as a result of NO reduction in brain is thought to occur, that may be associated with NOS activity inhibition [30].

As NO promotes active vasodilatation and is known to be one of the major blood flow regulating factors and which controls basal arterial pressure [13], the noticed increased nitrite level in rat brain cortex may reflect blood flow centralization directed to blood flow maintenance via this brain structure.

Hypoxia is also known to inhibit eNOS gene transcription and stability of its mRNA [25], that in combination with the decreasing temperature may result in the fall of NO derivatives content and testify to a partial vasoconstriction or at least, to the impairment of endothelium-dependent vessel relaxation.

In contrast, when prolonging hypoxia, however [29], we noted the rise in nNOS expression and NO content increase. There is an idea, that increasing the synthesis of neuronal NO in ischemic brain aggravates the damaging effect of hypoxia, while the rise in endothelial NOS activity shows a positive influence, first of all, due to active vessel dilatation [22]. It may be supposed therefore that endothelial NOS itself promotes in a greater extent the rise in NO derivatives level in rat brain cortex in our case.

The fall in the content of NO derivatives in liver and kidneys in our experiments may also be reflected by NOS activity decrease in response to oxygen concentration fall (the latter is NOS co-substrate), that may result in blood flow slowing in these organs and cause Na^+ excretion decrease and water delay in an animal's organism being in hypometabolic state [5]. Urine formation decrease is also characteristic for a natural hibernation [2].

It should also be noted that heart activity suppression (heart rate fall 360 to 80 beats/min) peculiar for hypometabolic state development, correlates in our case with nitrite content decrease in heart. This could be stipulated by the dependence of α -adrenergic of ino- and chronotropic responses upon NO level in cardiomyocytes [27].

As for iNOS activation certain time is needed (4 to 6 hrs) we might suppose that constitutive NOS (nNOS

Падение содержания конечных продуктов обмена NO в печени и почках в наших экспериментах, вероятно, отражает уменьшение активности NOS в ответ на падение концентрации кислорода (последний является косубстратом NOS), что может приводить к замедлению кровотока в этих органах и вызывать в почках уменьшение экскреции Na^+ и задержку воды в организме животного, находящегося в гипометаболическом состоянии [5]. Уменьшение мочеобразования характерно и для естественной спячки [2].

Следует отметить, что угнетение активности сердца (замедление частоты сердечных сокращений с 360 до 80 уд/мин), характерное для развития гипометаболического состояния, коррелирует в нашем случае с падением содержания нитрита в сердце. Это может быть обусловлено зависимостью α -адренергических ино- и хронотропного ответов от уровня NO в кардиомиоцитах [27].

Так как для активации iNOS требуется от 4 до 6 ч, можно было бы предположить, что ведущими в изменении концентрации конечных продуктов синтеза NO, по крайней мере на этапе развития ИГМС, являются конститутивные NOS (nNOS и eNOS), и, вполне вероятно, через 2 ч после ИГМС вклад iNOS в накопление нитритов мог бы возрастать и определять в дальнейшем уровень образования конечных продуктов обмена NO. И хотя нельзя отрицать вклада активации именно iNOS в этот период, следует отметить лишь нормализацию уровня нитрита в изученных тканях через 24 ч после ИГМС.

Несмотря на то, что различные звенья регуляции метаболизма NO и могут нарушаться при кратковременных гипоксических воздействиях, активации iNOS не наблюдается (индукция iNOS мРНК и активность ее белковых продуктов устойчивы к гипоксии при $\text{pO}_2 > 32$ мм рт. ст.) [7], при этом остается неизвестным, являются ли такие биологические уровни гипоксии достаточными для нарушения синтеза NO iNOS из L-аргинина.

Более того, показано [33], что уровень NO в мозге возрастает не во время ишемии, а в период реперфузии, причем уровень кровотока в мозге, содержание лактата и воды оставалось без изменений. Однако в работе [12] отмечается, что общая активность вновь синтезированных NOS была подавленной в период ишемии-реперфузии.

Из представленных нами результатов следует, что рост содержания нитритов (кроме сыворотки крови, где уровень нитрита снижен) через 2 ч после ИГМС, по крайней мере, отражает восстановление нормального функционирования системы обмена NO.

Гиперкапния также приводит к гипотермии у многих видов позвоночных [9], но механизм

and eNOS) are leading in changing the concentration of NO derivatives synthesis, at least at the step of AHMS development, and it is quite possible that 2 hrs after AHMS the iNOS contribution in nitrites accumulation may increase and determine in future the level of NO derivatives synthesis. And if we shouldn't neglect the activation contribution of namely iNOS at this period, we should only note the nitrite level normalization in studied tissues in 24 hrs after AHMS.

Also, even if different regulation links of NO metabolism may be destroyed at short-term hypoxic effects, no iNOS activation is observed (mRNA iNOS induction and activity of its protein products are hypoxia-resistant at $\text{PO}_2 > 32$ mm mercury column) [7], while it is still unclear whether such biological levels of hypoxia are sufficient for impairment of NO iNOS synthesis of L-arginine.

NO level was shown to increase [33] in brain not as a result of ischemia, but during re-perfusion, while the blood flow level in brain, lactate and water content remained unchanged. The work [12] demonstrated the total activity of newly synthesized NOS remained suppressed during the period of ischemia-reperfusion.

Noted by us rise in nitrite content 2 hours after AHMS (except blood serum where their fall is noted) is thought to reflect the recovery of normal functioning of NO metabolism system.

Hypercapnia is also known to cause hypothermia in a number of vertebrate animals [9]. Although the mechanism of hypercapnic hypothermia development may differ on hypoxic hypothermia, though it is supposed that in both cases L-arginine-NO-pathways are involved in thermoregulation system, as well as central ones, which shift the set point down to the lowest level in golden hamsters [23].

Other authors think hypercapnia does not noticeably influence metabolism even at low temperature and its effect considerably differs on hypometabolic response to hypoxia [31].

As for the cooling factor, the temperatures used and the effect duration result, first of all, in the activation of thermoregulation system [4] and, as our work has demonstrated [6] do not cause a statistically significant fall in the level of NO derivatives (except blood serum where the nitrite level significantly decreased), this is consistent with the data on the absence of NOS activity changes at short-term cold effects [28].

Conclusions

Thus a combined effect of an increasing hypoxia and hypercapnia on the background of cooling is thought to cause no serious NO metabolism impairments in both hibernating and non-hibernating animals by affecting the same L-arginine NO-pathways. The changes noted are probably of

развития гиперкапнической гипотермии может отличаться от такового при гипоксической гипотермии, хотя предполагается, что в обоих случаях в систему терморегуляции вовлекаются L-аргининовые-NO-пути, в том числе центральные, сдвигающие set point к нижнему уровню [23].

Отмечено, [31], что гиперкапния не оказывает заметного влияния на метаболизм даже при низкой температуре и ее эффект значительно отличается от гипометаболического ответа на гипоксию.

Использованные нами температура и длительность воздействия приводят к активации системы терморегуляции [4] и не вызывают достоверного снижения уровня конечных продуктов обмена NO (за исключением сыворотки крови, где уровень нитрита значительно снижался) [6], что согласуется с данными об отсутствии изменений активности NOS при кратковременных холодных воздействиях [28].

Выводы

Таким образом, сочетанное действие нарастающей гипоксии и гиперкапнии на фоне охлаждения, по-видимому, затрагивая одни и те же L-аргининовые NO-пути, не приводит к серьезным нарушениям обмена NO у гибернарующих и негибернарующих животных. Отмеченные изменения носят, очевидно, адаптивный характер, восстанавливаются в основном уже через 2 ч и окончательно нивелируются через 24 ч после возвращения животных в нормальные условия. Исключение составляет сниженный уровень нитрита в крови у животных, способных к гибернации.

Литература

1. Ванханен В.Д., Суханова Г.А. Техника санитарно-гигиенических исследований. – Киев: Вища школа, 1983. – С. 236-237.
2. Мельничук С.Д. Гиперкапния как фактор регуляции обмена веществ у животных в состоянии естественного и искусственного гипобиоза: Автореф. дис... канд. биол. наук. – Киев, 1995. – 16 с.
3. Слоним А.Д. Гетеротермия и физиологический гомеостаз. Эволюционные аспекты гипобиоза и зимней спячки: Сб. трудов / Под ред. Е.М. Кребса. – Л.: Наука, 1986. – С. 44-48.
4. Стабровский Е.М., Коровин К.Ф. Катехоламины в тканях крыс и их обмен при охлаждении // Физиол. журн. СССР. – 1972. – Т. 58, №3. – С. 414-420.
5. Тимофеев Н.Н., Прокопьева Л.П. Нейрохимия гипобиоза и пределы криорезистентности организма. – М.: Медицина, 1997. – 208 с.
6. Шило А.В., Ломако В.В., Бондарь Т.Н., Бабийчук Г.А. Влияние мягкой и холодной депривации сна на содержание конечных продуктов обмена оксида азота // 4-я Всерос. конф. "Актуальные проблемы сомнологии": Тез. докл. – М., 2004. – С. 64.
7. Archer S. L., Freude K. A., Shultz P. J. Effect of Graded Hypoxia on the Induction and Function of Inducible Nitric Oxide Synthase in Rat Mesangial Cells // Circulation Research. – 1995. – Vol. 77. – P. 21-28.

adaptive character, and are mainly leveled already by 2 hrs, and completely leveled in 24 hrs after returning the animals into normal conditions. The exception is the decreased nitrite level in animals' blood capable of hibernating.

References

1. Vankhanen V.D., Sukhanova G.A. Technique for sanitary-hygienic studies. – Kiev: Vyscha shkola, 1983. – P. 236-237.
2. Melnichuk S.D. Hypercapnia as a factor for metabolism regulation in animals in the state of natural and artificial hypobiosis: Author's thesis for candidate of science degree obtaining (biology). – Kiev, 1995. – 16p.
3. Slonim A.D. Heterothermia and physiological homeostasis. Evolutional aspects of hypobiosis and winter hibernation/ edited by E.M.Creps: Collection of works. – Leningrad: Nauka, 1986. – P. 44-48.
4. Stabrovsky E.M., Korovin K.F. Catecholamines in rat tissues and their metabolism when cooling // Physiological Journal of USSR. – Vol. 58. – P. 414-420.
5. Timofeev N.N., Prokopyeva L.P. Neurochemistry of hypobiosis and limits of organism cryoresistance. – Moscow: Meditsina, 1997. – 208 p.
6. Shilo A.V., Lomako V.V., Bondar T.N. Effect of soft and cold sleep deprivation on the content of final products of nitrogen oxide metabolism // The 4th All-Russian Conference "Actual problems of somnology": Procurements of the report. – Moscow, 2004. – P.
7. Archer S. L., Freude K. A., Shultz P. J. Effect of Graded Hypoxia on the Induction and Function of Inducible Nitric Oxide Synthase in Rat Mesangial Cells // Circulation Research. – 1995. – Vol. 77. – P. 21-28.
8. Bachmann S., Mundel P. Nitric oxide in the kidney: synthesis, localization, and function // Am.J.Kidney Dis. – 1994. – Vol. 24. – P. 112-129.
9. Barros R. C. H., Branco L. G. S. Effect of nitric oxide synthase inhibition on hypercapnia-induced hypothermia and hyperventilation // J. Appl. Physiol. – 1998. – Vol. 85, N3. – P. 967-972.
10. Branco L. G., Carnio E. C., Barros R. C. Role of the nitric oxide pathway in hypoxia-induced hypothermia of rats // Am J. Physiol. Regul. Integr. Comp Physiol. – 1997. – Vol. 273, 3. – P. 967-R971.
11. Bruhwylter J., Chleide E., Liégeois J.F., Carreer F. Nitric oxide: A new messenger in the brain // Neurosci. Biobehav. Rev. – 1993. – Vol. 17. – P. 373-384.
12. Cardella J.A., Keshavjee S.H., Bai X.H. et al. Increased expression of nitric oxide synthase in human lung transplants after nitric oxide inhalation // Transplantation. – 2004. – Vol. 77, N6. – P. 886-890.
13. Charbit M., Blazy I., Gogusev J. et al. Nitric oxide and the renin angiotensin system: contributions to blood pressure in the young rat // Pediatr.Nephrol. – 1997. – Vol. 11, N5. – P. 617-622.
14. Conte A. Physiologic pH changes modulate calcium ion dependence of brain nitric oxide synthase in *Carassius auratus* // Biochimica et Biophysica Acta. – 2003. – Vol. 1619, N1. – P. 29-38.
15. Davis M.E., Cai H., Drummond G.R., Harrison D.G. Shear stress regulates endothelial nitric oxide synthase expression through c-Src by divergent signaling pathways // Circ. Res. – 2001. – Vol. 89. – P. 1073-1080.
16. Forstermann U., Closs E.I., Pollock J.S. et al. Nitric oxide synthase isozymes, characterization, purification, molecular cloning and function // Hypertension. – 1994. – Vol. 23. – P. 1121-1131.

8. *Bachmann S., Mundel P.* Nitric oxide in the kidney: synthesis, localization, and function // *Am.J.Kidney Dis.*– 1994.– Vol. 24.– P. 112-129.
9. *Barros R. C. H., Branco L. G. S.* Effect of nitric oxide synthase inhibition on hypercapnia-induced hypothermia and hyperventilation // *J. Appl. Physiol.*– 1998.– Vol. 85, N3.– P. 967-972.
10. *Branco L. G., Carnio E. C., Barros R. C.* Role of the nitric oxide pathway in hypoxia-induced hypothermia of rats // *Am J. Physiol. Regul. Integr. Comp Physiol.* –1997. – Vol. 273, N3.– P. 967-R971.
11. *Bruhwyler J., Chleide E., Liégeois J.F., Carreer F.* Nitric oxide: A new messenger in the brain // *Neurosci. Biobehav. Rev.*– 1993.– Vol. 17.– P. 373-384.
12. *Cardella J.A., Keshavjee S.H., Bai X.H. et al.* Increased expression of nitric oxide synthase in human lung transplants after nitric oxide inhalation // *Transplantation.* – 2004.– Vol.77, N6.– P. 886-890.
13. *Charbit M., Blazy I., Gogusev J. et al.* Nitric oxide and the renin angiotensin system: contributions to blood pressure in the young rat // *Pediatr.Nephrol.*– 1997.– Vol.11, N5.– P. 617-622.
14. *Conte A.* Physiologic pH changes modulate calcium ion dependence of brain nitric oxide synthase in *Carassius auratus* // *Biochimica et Biophysica Acta.* – 2003. – Vol. 1619, N1.– P. 29-38.
15. *Davis M.E., Cai H., Drummond G.R., Harrison D.G.* Shear stress regulates endothelial nitric oxide synthase expression through c-Src by divergent signaling pathways // *Circ Res.* – 2001.– Vol. 89.– P. 1073-1080.
16. *Forstermann U., Closs E.I., Pollock J.S. et al.* Nitric oxide synthase isozymes, characterization, purification, molecular cloning and function // *Hypertension.*– 1994.– Vol. 23.– P. 1121-1131.
17. *Gautier H., Murariu C.* Role of nitric oxide in hypoxic hypometabolism in rats // *J. Applied Physiology.* – 1999.– Vol. 87, N1.– P. 104-110.
18. *Gerstberger R.* Nitric oxide and body temperature control // *News Physiol. Sci.* – 1999. – Vol. 14, N2.– P. 30-36.
19. *Gordon C.J., Fogelson L.* Comparative effects of hypoxia on behavioral thermoregulation in rats, hamsters and mice // *Am.J.Physiol.* – 1991.– Vol. 260.– P. R120-R125.
20. *Guo F.H., De Raeve H.R., Rice T.W. et al.* Continuous nitric oxide synthesis by inducible nitric oxide synthase in normal human airway epithelium in vivo // *Proc. Natl. Acad. Sci. US.*– 1995.– Vol. 92.– P. 7809-7813.
21. *Hunley T.E., Iwasaki S., Homma T., Kon V.* Nitric oxide and endothelin in pathophysiological settings // *Pediatr.Nephrol.*– 1995.– Vol. 9, N2.– P. 235-244.
22. *Huong Z., Huong P.L., Panahian N. et al.* Effect of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase // *Science.*– 1994. – Vol. 265.– P. 1883-1885.
23. *Kuhnen G., Wloch B., Wünnenberg W.* Effects of acute hypoxia and/or hypercapnia on body temperatures and cold induced thermogenesis in the golden hamster // *J. Therm. Biol.*– 1987.– Vol. 12.– P. 103-107.
24. *Macdonald P., Read M., Dusing G.* Synergistic inhibition of platelet aggregation by endothelium-derived relaxing factor and prostacyclin // *Thromb. Res.*– 1988.– Vol.49.– P. 437-449.
25. *McQuillan L.P., Leung G.K., Marsden P.A. et al.* Hypoxia inhibits expression of eNOS via transcriptional and post-transcriptional mechanisms // *Am. J. Physiol.*– 1994.– Vol. 267.– P. H1921-1927.
26. *Nathan C., Hibbs J.V.* Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity // *Curr Opinion in Immunology.*– 1991.– N3.– P. 65- 70.
27. *Paulus W.J., Vantrimpont P.J., Shah A.M.* Acute effects of nitric oxide on left ventricular relaxation and diastolic distensibility in humans. Assessment by bicoronary sodium nitroprusside infusion // *Circulation.*– 1994.– Vol. 89.– P. 2070-2078.
17. *Gautier H., Murariu C.* Role of nitric oxide in hypoxic hypometabolism in rats // *J. Applied Physiology.* – 1999.– Vol. 87, N1.– P. 104-110.
18. *Gerstberger R.* Nitric oxide and body temperature control // *News Physiol. Sci.* – 1999. – Vol. 14, N2.– P. 30-36.
19. *Gordon C.J., Fogelson L.* Comparative effects of hypoxia on behavioral thermoregulation in rats, hamsters and mice // *Am.J.Physiol.* – 1991.– Vol. 260.– P. R120-R125.
20. *Guo F.H., De Raeve H.R., Rice T.W. et al.* Continuous nitric oxide synthesis by inducible nitric oxide synthase in normal human airway epithelium in vivo // *Proc. Natl. Acad. Sci. US.*– 1995.– Vol. 92.– P. 7809-7813.
21. *Hunley T.E., Iwasaki S., Homma T., Kon V.* Nitric oxide and endothelin in pathophysiological settings // *Pediatr.Nephrol.*– 1995.– Vol. 9, N2.– P. 235-244.
22. *Huong Z., Huong P.L., Panahian N. et al.* Effect of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase // *Science.*– 1994. – Vol. 265.– P. 1883-1885.
23. *Kuhnen G., Wloch B., Wünnenberg W.* Effects of acute hypoxia and/or hypercapnia on body temperatures and cold induced thermogenesis in the golden hamster // *J. Therm. Biol.*– 1987.– Vol. 12.– P. 103-107.
24. *Macdonald P., Read M., Dusing G.* Synergistic inhibition of platelet aggregation by endothelium-derived relaxing factor and prostacyclin // *Thromb. Res.*– 1988.– Vol.49.– P. 437-449.
25. *McQuillan L.P., Leung G.K., Marsden P.A. et al.* Hypoxia inhibits expression of eNOS via transcriptional and post-transcriptional mechanisms // *Am. J. Physiol.*– 1994.– Vol. 267.– P. H1921-1927.
26. *Nathan C., Hibbs J.V.* Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity // *Curr Opinion in Immunology.*– 1991.– N3.– P. 65- 70.
27. *Paulus W.J., Vantrimpont P.J., Shah A.M.* Acute effects of nitric oxide on left ventricular relaxation and diastolic distensibility in humans. Assessment by bicoronary sodium nitroprusside infusion // *Circulation.*– 1994.– Vol. 89.– P. 2070-2078.
17. *Gautier H., Murariu C.* Role of nitric oxide in hypoxic hypometabolism in rats // *J. Applied Physiology.* – 1999.– Vol. 87, N1.– P. 104-110.
18. *Gerstberger R.* Nitric oxide and body temperature control // *News Physiol. Sci.* – 1999. – Vol. 14, N2.– P. 30-36.
19. *Gordon C.J., Fogelson L.* Comparative effects of hypoxia on behavioral thermoregulation in rats, hamsters and mice // *Am.J.Physiol.* – 1991.– Vol. 260.– P. R120-R125.
20. *Guo F.H., De Raeve H.R., Rice T.W. et al.* Continuous nitric oxide synthesis by inducible nitric oxide synthase in normal human airway epithelium in vivo // *Proc. Natl. Acad. Sci. US.*– 1995.– Vol. 92.– P. 7809-7813.
21. *Hunley T.E., Iwasaki S., Homma T., Kon V.* Nitric oxide and endothelin in pathophysiological settings // *Pediatr.Nephrol.*– 1995.– Vol. 9, N2.– P. 235-244.
22. *Huong Z., Huong P.L., Panahian N. et al.* Effect of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase // *Science.*– 1994. – Vol. 265.– P. 1883-1885.
23. *Kuhnen G., Wloch B., Wünnenberg W.* Effects of acute hypoxia and/or hypercapnia on body temperatures and cold induced thermogenesis in the golden hamster // *J. Therm. Biol.*– 1987.– Vol. 12.– P. 103-107.
24. *Macdonald P., Read M., Dusing G.* Synergistic inhibition of platelet aggregation by endothelium-derived relaxing factor and prostacyclin // *Thromb. Res.*– 1988.– Vol.49.– P. 437-449.
25. *McQuillan L.P., Leung G.K., Marsden P.A. et al.* Hypoxia inhibits expression of eNOS via transcriptional and post-transcriptional mechanisms // *Am. J. Physiol.*– 1994.– Vol. 267.– P. H1921-1927.
26. *Nathan C., Hibbs J.V.* Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity // *Curr Opinion in Immunology.*– 1991.– N3.– P. 65- 70.
27. *Paulus W.J., Vantrimpont P.J., Shah A.M.* Acute effects of nitric oxide on left ventricular relaxation and diastolic distensibility in humans. Assessment by bicoronary sodium nitroprusside infusion // *Circulation.*– 1994.– Vol. 89.– P. 2070-2078.
31. *Saiki C., Mortola J.P.* Effect of CO₂ on the metabolic and ventilatory responses to ambient temperature in conscious adult and newborn rats // *The Journal of Physiology.*– Vol. 491, Issue 1. – P. 261-269.
32. *Schulz R., Schmidt D., Blum A. et al.* Decreased plasma levels of nitric oxide derivatives in obstructive sleep apnoea: response to CPAP therapy // *Thorax.*– 2000.– Vol.55.– P. 1046-1051.
33. *Segawa D., Hatori N., Yoshizu H. et al.* The effect of nitric oxide synthase inhibitor on reperfusion injury of the brain under hypothermic circulatory arrest // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*– 1998. – Vol. 115.– P. 925-930.
34. *Snyder S.H.* Nitric oxide: First in a new class of neurotransmitters? // *Science.*– 1992.– Vol. 257.– P. 494-496.
35. *Viinikka L.* Nitric oxide as a challenge for the clinical chemistry laboratory // *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*– 1996.– Vol. 56.– P. 577-581.
36. *Wang Y., Marsden P.A.* Nitric oxide synthases: biochemical and molecular regulation // *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*– 1995.– Vol. 4.– P. 12-22.

28. *Peralta J. G., Finocchietto P. V., Converso D. et al.* Modulation of mitochondrial nitric oxide synthase and energy expenditure in rats during cold acclimation // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*– 2003.– Vol. 284, N6.– P. H2375-H2383.
29. *Prabhakar N. R., Pieramici S. F., Premkumar D. R. D. et al.* Activation of nitric oxide synthase gene expression by hypoxia in central and peripheral neurons // *Mol. Brain Res.* – 1996. – Vol. 43 – P. 341-346.
30. *Rengasamy A., Johns R. A.* Characterization of endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase from bovine cerebellum and mechanism of modulation by high and low oxygen tensions // *J. Pharmacol. Exp. Ther.*– 1991.– Vol. 259.– P. 310-316.
31. *Saiki C., Mortola J.P.* Effect of CO₂ on the metabolic and ventilatory responses to ambient temperature in conscious adult and newborn rats // *The Journal of Physiology.*– Vol. 491, Issue 1.– P. 261-269.
32. *Schulz R., Schmidt D., Blum A. et al.* Decreased plasma levels of nitric oxide derivatives in obstructive sleep apnoea: response to CPAP therapy // *Thorax.*– 2000.– Vol. 55.– P. 1046–1051.
33. *Segawa D., Hatori N., Yoshizu H. et al.* The effect of nitric oxide synthase inhibitor on reperfusion injury of the brain under hypothermic circulatory arrest // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*– 1998. – Vol. 115.– P. 925-930.
34. *Snyder S.H.* Nitric oxide: First in a new class of neurotransmitters? // *Science.*– 1992.– Vol. 257.– P. 494-496.
35. *Viinikka L.* Nitric oxide as a challenge for the clinical chemistry laboratory // *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*– 1996.– Vol. 56.– P. 577–581.
36. *Wang Y., Marsden P.A.* Nitric oxide synthases: biochemical and molecular regulation // *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*– 1995.– Vol. 4.– P. 12-22.
37. *Yun H.-Y., Dawson V.L., Dawson T.M.* Nitric oxide in health and disease of the nervous system // *Molecular Psychiatry.*– 1997.– N2. – P. 300-310.

Accepted 31.12.2004

Поступила 31.12.2004