



UNIVERSITÀ DELLA CALABRIA

FACOLTÀ DI SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E NATURALI

Dottorato di Ricerca in "Biologia Animale"

Scuola di Dottorato "Life Sciences"

XXV CICLO

Settore disciplinare BIO/09

I nitriti come molecola segnale: effetti diretti e indiretti sulla regolazione dell'attività cardiaca

Candidata

Dott.ssa Gabriella Montesanti,

Direttore

Chiar.mo Prof. Marcello Canonaco

Tutor

Dott.ssa Daniela Pellegrino

Coordinatore

Chiar.mo Prof. Maria Carmela Cerra

Indice

SUMMARY	1
PREMESSA E SCOPO	4
INTRODUZIONE	7
1. Fonti di nitriti	8
2. Riconversione dei nitriti ad NO	10
3. Il ciclo dello NO	12
3.1 Emoglobina e mioglobina sono due nitrito riduttasi	14
3.1.1 Riduzione dei nitriti emoglobina-dipendente e vasodilatazione ipossica	14
3.1.2 Attività Nitrito reduttasica della Mioglobina e Omeostasi Redox a livello cardiaco	18
3.2 Xantina ossidoreduttasi è un importante nitrito-reduttasi	20
4. Effetti vasali mediati dai nitriti	21
5. Effetti cardiaci mediati dai nitriti	23
5.1 Protezione nitriti-mediata contro danni da ischemia/riperfusion	23
5.2 Modulazione dell'inotropismo cardiaco: un quadro comparato	26
5.2.1 Modulazione nitregica del meccanismo di Frank-Starling	28
6. S-nitrosilazione	30
6.1 S-nitrosilazione a livello cardiaco	32
6.1.1 I canali ionici per il K ⁺ “inwardly rectifier”	33
MATERIALI E METODI	35
1 Metodica Langendorff	36
1.1 Animali	36
1.2 Apparato di perfusione	37
1.3 Perfusione e composizione del perfusato	38
1.4 Dissezione, isolamento ed incannulazione del cuore	39
1.5 Misurazione dell'attività contrattile del cuore	41

1.6 Sistema di acquisizione e registrazione dei parametri	42
1.7 Parametri dell'attività cardiaca	42
1.8 Risposta cardiaca del meccanismo di Frank-Starling	44
2 Dosaggio elisa:determinazione di cGMP-cAMP intracellulare	46
3 Western blotting	46
3.1 Sostanze chimiche	48
4 Biotin switch-assay	49
5 Separazione su gradiente di saccarosio	50
6 Dosaggio intermedi reazione nitriti-Hb	52
7 Analisi statistica	54
<i>RISULTATI</i>	55
1. Interazione dei nitriti con l'emoglobina a basse e alte saturazioni di ossigeno	56
2. Influenza dei nitriti sulla risposta cardiaca al meccanismo di Frank-Starling	58
3. Ruolo dello NO e dello HNO nella risposta di Frank-starling	60
4. Coinvolgimento della cascata trasduzionale cGMP-PKG nella risposta di Frank-Starling	63
5. Coinvolgimento delle pompe SERCA2a nella risposta di Frank-starling	65
6. S-nitrosilazione delle proteine cardiache	66
<i>DISCUSSIONE</i>	72
1. NO generato dai nitriti e la risposta Frank-Starling	75
2. Meccanismi di traduzione del segnale nitriti-NO	77
3. S-nitrosilazione delle proteine cardiache	79
<i>BIBLIOGRAFIA</i>	85

SUMMARY

Nitrite anion is a physiological NO storage form and an alternative way for NO generation, recently emerged as a cardioprotective endogenous modulator. Using Langendorff perfused rat hearts, as paradigms of mammals heart, we explored nitrite influence on the Frank-Starling response. We demonstrated that, like NO, exogenous nitrite improves the Frank-Starling response in rat heart as indicated by Left Ventricular Pressure (LVP) and the maximal rate of LVP decline (LVdP/dt_{max}), used as indexes of inotropism. Noteworthy, the minimal negative derivative of intraventricular pressure, LVdP/dt_{min}, used as indexes of lusitropism, was positively affected by nitrite, suggesting the anion involvement not only in the systolic but also in the diastolic phase. This positive influence of nitrite was unaffected by endocardial endothelium impairment and NOS inhibition. In addition, the effect resulted sensitive to NO scavengers, independent on nitroxyl anion, and mediated by a cGMP/PKG-dependent pathway. These results suggest that nitrite acts as a physiological source of NO modulating the stretch-induced intrinsic regulation of the mammals heart.

Moreover, nitrite affects numerous biological processes through NO-independent pathways (Bryan et al., 2005), including the S-nitrosylation of thiol-containing proteins (Foster et al., 2003). The mechanisms underlying these phenomena, until now not fully understood, are of great interest because of their cardiovascular therapeutic potential. In the last part of this study we analysed in the rat heart whether nitrite affect S-nitrosylation of cardiac proteins and the potential targets for S-nitrosylation.

Rat hearts, perfused according to Langendorff, were exposed to nitrite and then analysed by Biotin Switch Method. We showed that nitrite increased the degree of S-nitrosylation of a broad range of membrane proteins. Further analysis, conducted on subfractioned proteins, allowed us to identify a high level of nitrosylation in a small range of plasmalemmal proteins (45-50 kDa). The increment in S-nitrosylation at this

location was characterized by using an anti-Kir2.1 rabbit polyclonal antibody. We also verified that this effect of nitrite is preserved in the presence of the NO scavenger P-TIO. Finally, we wanted to investigate the direct effects of nitrite using two specific inhibitors of the major nitrite reductase in the heart, xantine oxidoreductase and citocrome P450 (allopurinol and ketoconazole respectively). The effect of nitrite in the presence of these inhibitors is a bit reduced compared to control. A further analysis of this result, we used nitrite in the presence of N-acetyl-L-cysteine (NAC), a specific inhibitor of the nitroxyl anion (HNO). In this case, unlike that observed with the P-TIO, the effect of nitrite is significantly reduced.

Our results suggest, for the first time, that nitrite represents a direct S-nitrosylating agent in cardiac tissues and that Kir2.1 channels are one of the targets. These observations are of relevance since they support the growing evidence that nitrite is not only a NO reserve but also a direct modulator of important functional cardiac proteins.

PREMESSA E SCOPO

I nitriti, oltre ad essere un prodotto metabolico dell'ossido nitrico (NO), sono anche una fonte NOS-indipendente dello NO ed una molecola segnale intrinseca implicata in molti processi biologici. Questi anioni rappresentano infatti la più grande riserva fisiologica dello NO in svariate cellule e tessuti e possono essere ridotti allo NO bioattivo attraverso reazioni che avvengono tipicamente a pH acido e in carenza di ossigeno e si verificano dunque in stati patologici, quali l'ischemia (Duranski et al., 2005; Webb et al., 2004). *In vivo*, differenti pathways sono stati proposti per chiarire la riconversione dei nitriti nello NO, tra cui disproporzione acidica (Modin et al., 2001), conversione enzimatica attraverso xantina ossido reduttasi (XOR) (Li et al., 2005), enzimi mitocondriali (Castello et al., 2006), deossiemoglobina (deossi-Hb) e deossimioglobina (deossi-Mb) (Cosby et al., 2003; Huang et al., 2005a; Huang et al., 2005b; Nagababu et al., 2003; Shiva et al., 2007; Rassaf et al., 2007). L'importanza della produzione dello NO mediata dai nitriti e la loro funzione in qualità di molecola segnale in grado di mediare direttamente diverse risposte biologiche sono state dimostrate anche nel sistema cardiovascolare, in particolar modo in relazione a vasodilatazione (Maher et al., 2008), angiogenesi (Kumar et al., 2008) e cardioprotezione (Bryan et al., 2007; Duranski et al., 2005). È stato recentemente riportato che i nitriti inducono inotropismo negativo nel cuore di ratto attraverso meccanismi di trasduzione che includono un pathway trasduzionale cGMP-PKG-dipendente (Pellegrino et al., 2009), suggerendo quindi che nei cuori di mammiferi questi anioni rappresentano una fonte significativa di NO bioattivo che modula la performance cardiaca.

La modulazione NO/nitriti-dipendente può avvenire attraverso modificazioni post-trasduzionali delle proteine coinvolte in numerosi pathways di trasduzione del segnale cellulare come la S-nitrosilazione dei gruppi sulfridrilici della cisteina (Martinez-Ruiz e Lamas, 2004). La S-nitrosilazione rappresenta una reazione modulatoria paragonabile

alla più nota fosforilazione ed è attualmente al centro di numerosi studi soprattutto per quanto riguarda gli effetti dello NO cGMP-indipendenti (Broillet 1999).

Il meccanismo di Frank-Starling (la regolazione cardiaca eterometrica) è una proprietà fondamentale del cuore dei vertebrati che permette al miocardio di rispondere adeguatamente all'incremento del ritorno venoso (precarico). Questo meccanismo è centrale per la regolazione della gittata cardiaca in quanto un aumento della lunghezza delle fibre muscolari (stretch) ha come risposta un aumento della contrattilità (Allen e Kentish, 1985; Lillywhite et al., 1999).

Sebbene sia noto che lo NO diminuendo la rigidità diastolica contribuisce in maniera significativa alla risposta Frank-Starling nei mammiferi (Casadei e Sears, 2003), non si conosce nulla che riguardi il coinvolgimento dei nitriti su questa fondamentale proprietà del cuore.

Lo scopo di questo studio è stato quindi quello di analizzare le influenze dei nitriti sulla risposta all'incremento del precarico nel cuore perfuso di ratto mediante metodica *Langendorff* nonché lo stato di S-nitrosilazione delle proteine cardiache e i possibili targets di questa reazione. Alla luce delle importanti implicazioni terapeutiche dei nitriti, questo duplice approccio sperimentale riveste notevole importanza non solo per fornire chiarimenti sulle funzioni "ancestrali" del sistema nitriti-NO a livello cardiaco nei vertebrati e quindi anche nell'uomo, ma anche per meglio comprendere l'attività biologica dei nitriti nel modulare le normali funzioni del cuore attraverso il processo di S-nitrosilazione.

INTRODUZIONE

1. Fonti di nitriti

Nei mammiferi, le fonti endogene di nitriti derivano soprattutto dall'ossidazione dell'ossido nitrico (NO), ma sono importanti anche fonti nutrizionali come carne, verdure e acqua oltre alla riduzione dei nitrati ingeriti grazie all'azione di batteri presenti sia nella bocca che del tratto gastrointestinale. Le concentrazioni di nitrati nell'acqua potabile sono di solito <10 mg/L in assenza di contaminazione batterica (Kross et al., 1993). Ortaggi e legumi, soprattutto barbabietole, sedano, e verdure a foglia verde come lattuga e gli spinaci sono ricchi di nitrati (Walker, 1996; Meah et al., 1994; Vallance, 1997). Per la popolazione media, la maggiore fonte alimentare di nitrati (86%) proviene dalla verdura, mentre i nitriti vengono assunti soprattutto con i salumi (39%), i prodotti da forno ed i cereali (34%), e solo in piccola parte con la verdura (16%). La concentrazione di nitriti endogena è rigorosamente regolata e dipende dalle necessità di ciascun tessuto o compartimento corporeo e dall'attività delle flavo-emoproteine ossido-nitrico sintasi (NOSs) (Bryan et al., 2005; Rodriguez et al., 2003). Le concentrazioni di nitriti nei tessuti sono maggiori rispetto alla quantità presente in circolo (Bryan et al., 2005). Le NOSs sono gli enzimi deputati alla sintesi dello NO a partire dall'amminoacido L-arginina attraverso una complessa reazione di ossidazione (Palmer et al., 1987) ed è stato dimostrato che, in esseri umani e altri mammiferi digiuni, questi enzimi sono responsabili fino al 70-90% della produzione totale di nitriti plasmatici (Kleinbongard et al., 2003). Accanto all'attività delle NOSs, anche batteri commensali anaerobi facoltativi presenti nella cavità orale, grazie alla loro attività nitrito reduttasica (Zweier et al., 1995), sono in grado di ridurre il nitrato, fornendo in tal modo un fonte alternativa di nitriti (Goaz e Biswell, 1961; Van Maanen et al., 1996). Infatti, i livelli plasmatici di nitriti aumentano dopo l'ingestione di grandi quantità di nitrati. Tale incremento è interamente dovuto alla circolazione entero-salivare di nitrato

(di cui il 25% è attivamente occupato dalle ghiandole salivari) e alla reazione di riduzione di nitriti che avviene nella bocca (Lundberg e Govoni, 2004). Questo pathway che dai nitrati porta alla formazione dello NO, tramite la loro riduzione a nitriti contribuisce a ridurre le infezioni del tratto gastrointestinale e aumentare lo spessore della mucosa gastrica e il flusso di sangue (Walker, 1996; Lundberg, et al., 1994) (fig. 1). Nel plasma, tra mammiferi di diverse specie, uomo compreso, le concentrazioni di nitriti sono stimate nel range compreso tra 150-600 nM, rimangono stabili per diverse ore e rappresentano un perfetto equilibrio tra ciò che viene prodotto e ciò che viene consumato (Bryan, 2006). Nel sangue, tuttavia, i nitriti e lo NO generato dalla loro riduzione sono rapidamente ossidati a nitrati. L'emivita di nitriti nel sangue umano è di circa 110 s, al contrario, i nitrati hanno un'emivita di 5-8 h e successivamente vengono eliminati attraverso i reni (Bryan, 2006).

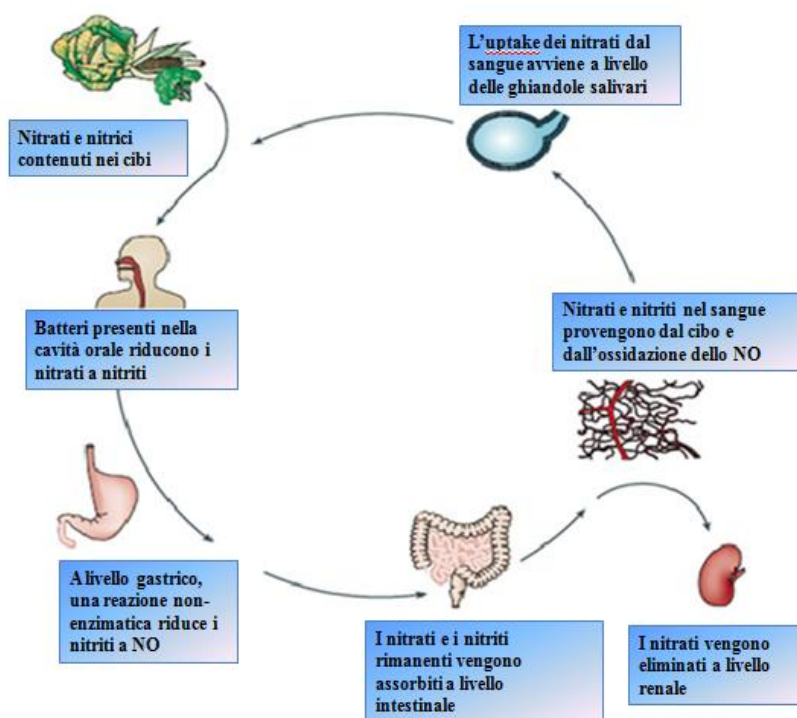


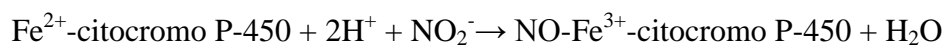
Fig. 1: Circolazione entero-salivare dei nitrati negli esseri umani. Dei nitrati inorganici provenienti dalle verdure, circa il 25% subisce una reazione di riduzione a livello salivare e successivamente vengono rapidamente assorbiti a livello gastrico e nell'intestino tenue dove, batteri anaerobi facoltativi riducono i nitrati a nitriti, convertendoli nello NO e altri ossidi di azoto. I nitrati e i nitriti sono assorbiti anche nel sangue e possono servire come fonte di NO nei tessuti in condizioni ipossiche (modificata da Lundberg et al., 2008).

2. Riconversione dei nitriti ad NO

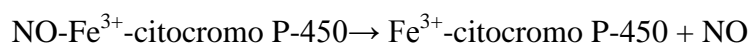
Per lungo tempo i nitriti sono stati considerati molecole biologicamente inattive in grado di indurre solo effetti tossici ad alte concentrazioni (Gangolli et al., 1994). Tuttavia, nell'ultimo decennio numerosi studi hanno messo in evidenza come questi anioni siano uno storage importante e fisiologico dello NO nel sangue e nei tessuti e rappresentino un'importante meccanismo alternativo che porta alla sintesi dello NO soprattutto durante eventi ischemici (Cosby et al., 2003). Questo nuovo meccanismo di produzione dello NO NOS-indipendente consiste nella riconversione dei nitriti allo NO tramite tre diversi meccanismi: riduzione enzimatica, disproporzionazione e riduzione acida (Ferrari et al., 1996; Cosby et al., 2003). L'attività nitrito-reduttasica è stata rilevata in specifici enzimi, come la glutatione-S-transferasi (Hill et al., 1992), la xantina ossidoreduttasi (Millar et al., 1998), il citocromo P-450 (Kozlov et al., 1999), la deossiemoglobina (deossi-Hb) (Gladwin et al., 2004), la eNOS in assenza di ossigeno (Gautier et al., 2006). Le condizioni perché tali reazioni avvengano si hanno tipicamente a pH acido e in carenza di ossigeno e si verificano dunque in stati patologici, quali l'ischemia quando l'attività delle NOSs è fortemente ridotta (Duranski et al., 2005; Webb et al., 2004).

Una delle più importanti nitrito-reduttasi sembra essere la xantina ossidoreduttasi. In condizioni di acidosi o durante processi infiammatori, danno post-ischemico (Wang e Zweier, 1996), shock da sepsi (Szabo et al., 1995), cardiomiopatie (Gutierrez et al., 1997; Kooy et al., 1997), aterosclerosi (Beckmann et al., 1994; Moriel e Abdalla, 1997) si ha la formazione di anione superossido (O_2^-) per azione di questo enzima (Kayyali et al., 2001; Godber et al., 2000). L'anione superossido può interagire con lo NO portando alla formazione di perossinitriti ($ONOO^-$), delle specie ossidanti non radicaliche, che reagiscono direttamente con i gruppi sulfidrilici delle proteine e con

molte molecole biologiche. La xantina ossido reduttasi può essere però anche una fonte dello NO in condizioni di ipossia, come ad esempio durante l'ischemia, poiché catalizza la reazione di riduzione dei nitriti ad NO. In queste condizioni, che limitano fortemente l'attività delle NOSs, l'attività delle xantine ossido reduttasi è aumentata. La reazione di trasformazione dei nitriti ad NO richiede però la presenza di superossido dismutasi (SOD), l'enzima che catalizza la seguente reazione: $2 O_2^- + 2 H^+ \rightleftharpoons O_2 + H_2O_2$ in modo tale che l'anione superossido non reagisca con lo NO per dare ONOO⁻, NO₂, N₂O₃. I livelli dei nitriti sono correlati all'attività delle eNOS (Gladwin et al., 2000; Lauer et al., 2001) infatti la concentrazione di nitriti è di circa 0.1-1.0 μM nel plasma, 0.5-2.0 μM nei tessuti ma arriva a 20 μM nei tessuti vascolari particolarmente ricchi di eNOS (Bryan et al., 2005). Accanto all'attività enzimatica di produzione dello NO dalla L-arginina, le eNOS rivestono un ruolo nitrito reduttasico importante. Studi condotti da Webb e collaboratori (2004) sul cuore di ratto isolato e perfuso secondo *Langendorff*, hanno dimostrato come la produzione dello NO a partire dai nitriti viene abolita dalla rimozione dell'endotelio e quindi dall'inattivazione della eNOS facendo ipotizzare che questo enzima possa essere coinvolto nella produzione dello NO anche a partire dai nitriti. Il meccanismo di riduzione dei nitriti ad NO può coinvolgere, inoltre, anche il citocromo P-450 che nella forma ridotta (Fe²⁺) può essere nitrosilato:



Il legame con il gruppo NO però è debole, quindi può essere rilasciato lo NO, ed il ferro del gruppo eme ritorna nella forma ossidata Fe³⁺:



La citocromo P-450 reduttasi può così donare un elettrone al ferro del gruppo eme del citocromo P-450, che si riduce: $Fe^{3+}\text{-citocromo P-450} \rightarrow Fe^{2+}\text{-citocromo P-450}$ e ritorna nella forma in cui può nuovamente prendere parte alla reazione.

3. Il ciclo dello NO

Reutov e collaboratori (1998) hanno dimostrato per la prima volta l'esistenza di un ciclo per quanto riguarda la produzione e la conversione dello NO nei mammiferi. In accordo con questo concetto generale, la conversione ciclica dello NO è il risultato evolutivo e adattativo della vita sulla terra e rende conto dei molteplici effetti che lo NO esplica sui vari livelli dell'organizzazione biologica dei sistemi viventi. Il ciclo dello NO è costituito da due grandi componenti il sistema delle NOSs e il sistema nitrito-reduttasico. Quest'ultimo include le reazioni catalizzate da sistemi donatori di elettroni con la partecipazione di NADH, NADPH, flavo proteine come le xantine ossido reductasi, le citocromo ossidasi nei mitocondri, il citocromo P-450 nel reticolo endoplasmatico e le proteine che contengono un gruppo eme come la deossi-Hb. Nel processo ciclico dello NO, gli anioni nitriti e nitrati sono formati dall'ossidazione enzimatica/non enzimatica dello NO prodotto dalle NOSs e secondo la reazione: $\text{NO} \Rightarrow \text{NO}_2^- / \text{NO}_3^-$. Al contrario, la riduzione degli ioni NO_2^- ad NO: $\text{NO}_2^- + e^- \Rightarrow \text{NO}$ avviene attraverso una reazione nitrito-reduttasica. Nei globuli rossi questa reazione è catalizzata da elementi donatori di elettroni (NADH, NADPH, flavo proteine, deossi-Hb) e da sostanze a basso peso molecolare (glutazione ridotto, acido ascorbico) ed è in grado di produrre e rilasciare NO attivo, influenzando in questo modo la vasodilatazione locale. Pertanto, nonostante la chimica molto complessa di questo sistema, l'idea che un certo numero di composti elettrone-donatori, tra cui proteine contenenti eme (Hb, Mb), presentino un'importante attività nitrito-reduttasica, ha fornito la possibilità per chiudere la catena di trasformazioni metaboliche e produzione di composti a partire dallo NO secondo l'equazione generale: $\text{L-Arg} \Rightarrow \text{NO} \Rightarrow \text{NO}_2^- / \text{NO}_3^- \Rightarrow \text{NO}$ (Reutov et al., 1994; 1995). Esperimenti condotti da Jansson e collaboratori hanno documentato che, in tessuti umani e di roditori, un enzima funzionale con attività nitrato-reduttasica è

in grado di generare nitriti e lo NO e la sua azione è controbilanciata dall'allopurinolo, inibitore della xantina ossido reduttasi. In aggiunta, in ratti normossici, la somministrazione di nitrato determinava elevati livelli circolanti di nitriti che però venivano nuovamente attenuati in seguito a somministrazione di allopurinolo. Effetti simili sono stati osservati in topi privi di eNOS e privi di germi, escludendo in tal modo che la produzione di nitriti sia dovuta all'attività dell' eNOS o di batteri. Inoltre, il pretrattamento con nitrati attenuava l'aumento della pressione arteriosa sistemica causato da inibizione dell'eNOS e il flusso di sangue migliorava durante riperfusione post ischemica (Jansson et al., 2008). Nel plasma, il radicale libero NO viene convertito in nitrito e anioni nitrato in un rapporto di 5:1, ma, in presenza di ossiemoglobina, lo NO è quasi completamente ossidato per formare nitrato (Wennmalm et al., 1993; 1992). In conclusione, il pathway trasduzionale nitrati-nitriti-NO può essere visto come complementare alla via classica di produzione dello NO a partire dall'L-arginina per azione delle NOS. Questi pathways funzionano parzialmente in parallelo, ma quando la disponibilità di ossigeno è ridotta e l'attività delle NOS è diminuita, la riduzione NOS-indipendente dei nitriti ad NO diventa più pronunciata (Lundberg and Weitzberg, 2009). Le NOSs e gli enzimi con attività nitrito-reduttasica che compongono il ciclo dello NO sono riportati schematicamente in figura 2.

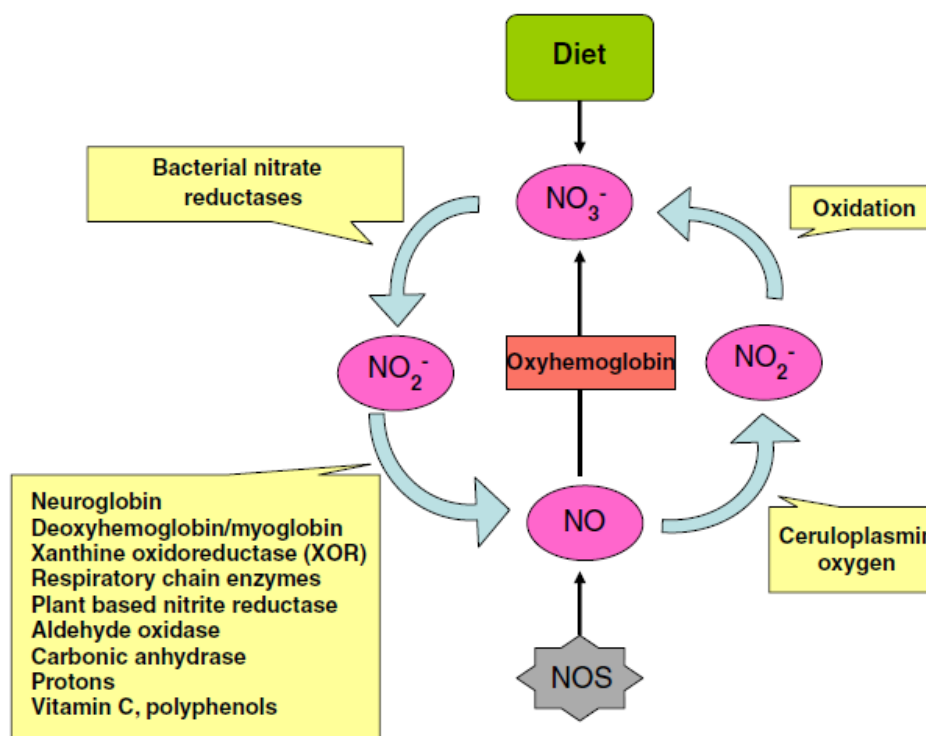


Fig. 2: Lo NO è generato dalle NOSs in diversi tipi di cellule e partecipa alla regolazione di numerosi processi fisiologici. La bioattività dello NO è in parte regolata dalla sua rapida ossidazione a nitriti o, in presenza di ossi-emoglobina, a nitrati che sono il maggior prodotto dell'ossidazione dello NO presente in circolo. Nel sangue e nei tessuti i nitriti possono essere ridotti a NO e altri ossidi bioattivi. Questa reazione può essere catalizzata da processi enzimatici e non-enzimatici, molti dei quali sono maggiormente attivi in condizioni di ipossia (Parthasarathy e Bryan, 2012).

3.1 Emoglobina e mioglobina sono due nitrito riduttasi

3.1.1 Riduzione dei nitriti emoglobina-dipendente e vasodilatazione ipossica

Storicamente, l'emoglobina (Hb) è stata considerata una proteina in grado di interagire con lo NO e inattivarlo subito dopo essere stato prodotto a livello vasale. L'attività scavenger dell'Hb nei riguardi dello NO si basa su una reazione di diossigenazione in cui lo NO reagisce con la Ossi-Hb per formare metaemoglobina e nitrato (Lancaster, 1994; Kim-Shapiro et al., 2006). Infatti in condizioni di normossia l'Hb eritrocitaria NO-scavenger produce un effetto vasocostrittore. Tuttavia, oltre al suo ruolo di scavenger dello NO durante la regolazione fisiologica della vasodilatazione NO-dipendente, l'Hb in condizioni ipossiche, è in grado di fornire lo NO (Gladwin, 2005).

Studi condotti da Gladwin e collaboratori (2004) hanno dimostrato che l'attività nitrito-reduttasica dell'emoglobina è in grado di generare lo NO sotto controllo allosterico e del pH, secondo un' equazione generale descritta da Brooks (1937) e da Doyle e collaboratori (1981): $\text{NO}_2^- + \text{Deossi-Hb (FeII)} + \text{H}^+ \Rightarrow \text{NO} + \text{metaemoglobina (FeIII)} + \text{OH}^-$, in cui la deossi-Hb catalizza la conversione di acido nitroso (HNO_2 , forma protonata dei nitriti) a NO. Il fatto che questa reazione avvenga in presenza di deossi-Hb e protoni indica un probabile meccanismo di rilevamento per l'ossigeno ed il pH, suggerendo un nuovo ruolo modulatore esplicato dalle proprietà redox dell'eme. Infatti, utilizzando modelli sperimentali di ipertensione polmonare indotta da ipossia, Hunter e collaboratori (2004) hanno dimostrato che la diminuzione della pressione arteriosa polmonare indotta da nitriti era direttamente pH-dipendente. Inoltre, Huang e collaboratori (2005) hanno dimostrato che la massima attività nitrito-reduttasica dell'Hb, che induce alla produzione dello NO, avviene vicino la transizione allosterica della proteina dallo stato R (rilassato) ossigenato allo stato T (teso) deossigenato. Essi hanno inoltre dimostrato che il tasso di riduzione dei nitriti a NO è massimo quando i valori di saturazione d'ossigeno dell'Hb sono intorno al 40-60%, che coincidono con la P_{50} di Hb, suggerendo un meccanismo per il sensing del legame allosterico dell'ossigeno alla vasodilatazione ipossica locale (fig. 3).

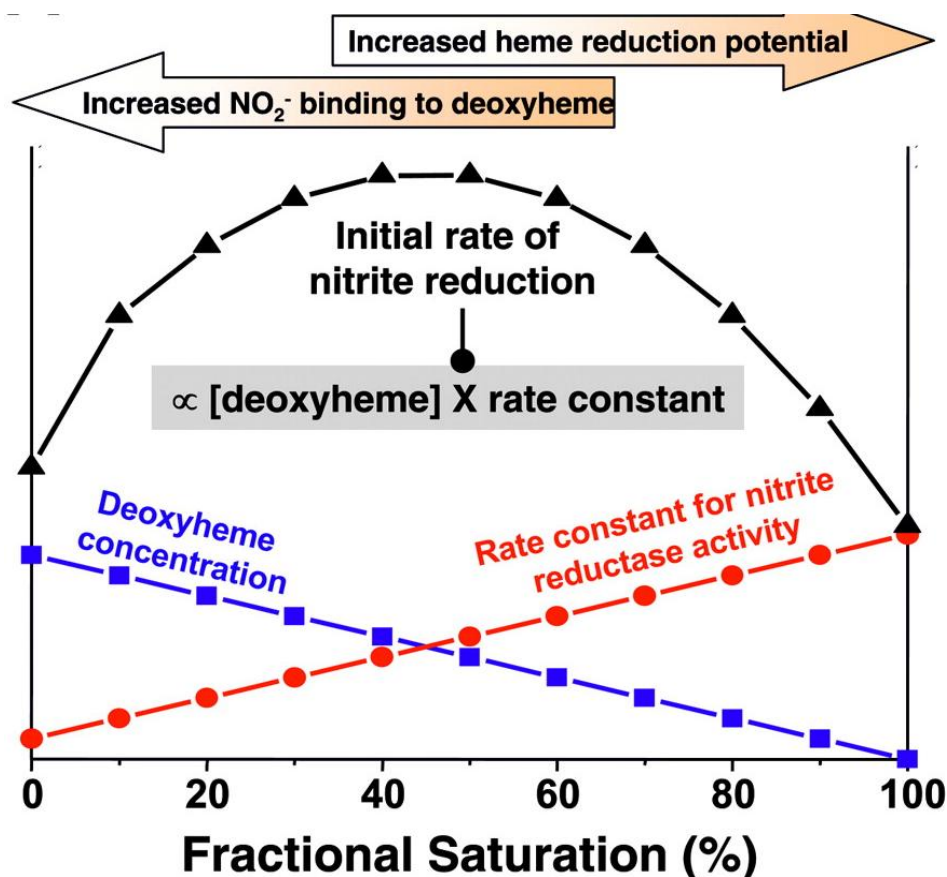


Fig. 3: Attività nitrito-reduttasica dell'Hb ossigeno-dipendente. Come la tensione dell'ossigeno aumenta la quantità di deossi-Hb diminuisce, mentre aumenta il numero degli stati R dell'Hb così come gli eme liberi. (Crawford et al., 2006).

Esiste la possibilità che la Hb, grazie alla sua conformazione strutturale tetramerică e la transizione di stato tra forma saturata ed insaturata di ossigeno, funga da "sensore di ossigeno" modulando la sua attività scavenger/reduttasi in base alle necessità. Per verificare questa ipotesi, sono stati misurati simultaneamente il tono vascolare e la concentrazione di ossigeno in anelli di aorta *in vitro* in presenza di nitriti con e senza eritrociti (Cosby et al., 2003; Crawford et al., 2006). In assenza di eritrociti, solo elevate concentrazioni di nitriti ($> 10 \mu\text{M}$) erano in grado di vasodilatare i vasi pre-costretti, mentre, in presenza degli eritrociti (0,3% ematocrito) è stata osservata vasodilatazione nitrito-dipendente a più basse concentrazioni (range fisiologico) e l'effetto veniva potenziato dall'ipossia (Cosby et al., 2003). Studi sulla cinetica condotti da Huang e

collaboratori (2005) hanno riportato l'insorgenza di una risposta significativa intorno alla P_{50} della Hb. Quando forme mutate di Hb con corrispondenti valori di P_{50} differenti sono state testate, la concentrazione di ossigeno al momento della comparsa della vasodilatazione era effettivamente correlata con il P_{50} della variante di Hb utilizzata. Inoltre, mentre non sembra essere obbligatorio che la reazione tra nitriti e Hb provochi vasodilatazione, i residui di cisteina in posizione 93 sono fondamentali nel modulare il processo. Una mutazione di questo residuo specifico diminuisce il potenziale redox dell'eme e questo effetto aumenta sia l'attività nitrito reductasica che la vasodilatazione a qualsiasi saturazione di Hb data (Crawford 2006). In definitiva, questi dati confermano l'idea che l'attività dei globuli rossi è accoppiata con la riduzione dei nitriti e conseguente generazione dello NO che, a sua volta, stimola la vasodilatazione. Il modello proposto è illustrato nella figura 4. Esiste la possibilità che l'effetto prevalente sulla vasodilatazione locale è raggiunto a livello delle venule di resistenza post capillare attraverso un'azione diretta sulle cellule muscolari lisce (fig. 5).

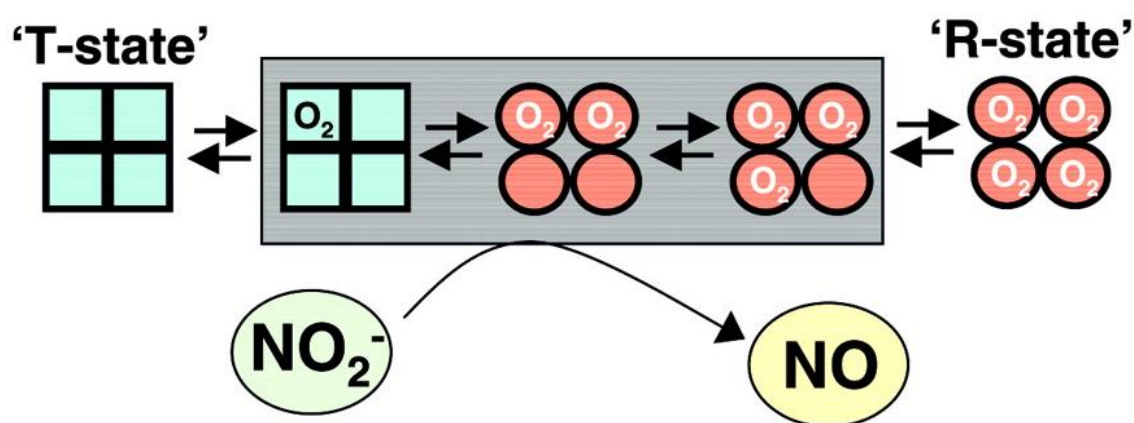


Fig. 4: Modello proposto per la regolazione allosterica mediata dalla deossi-Hb. (Crawford et al., 2006).

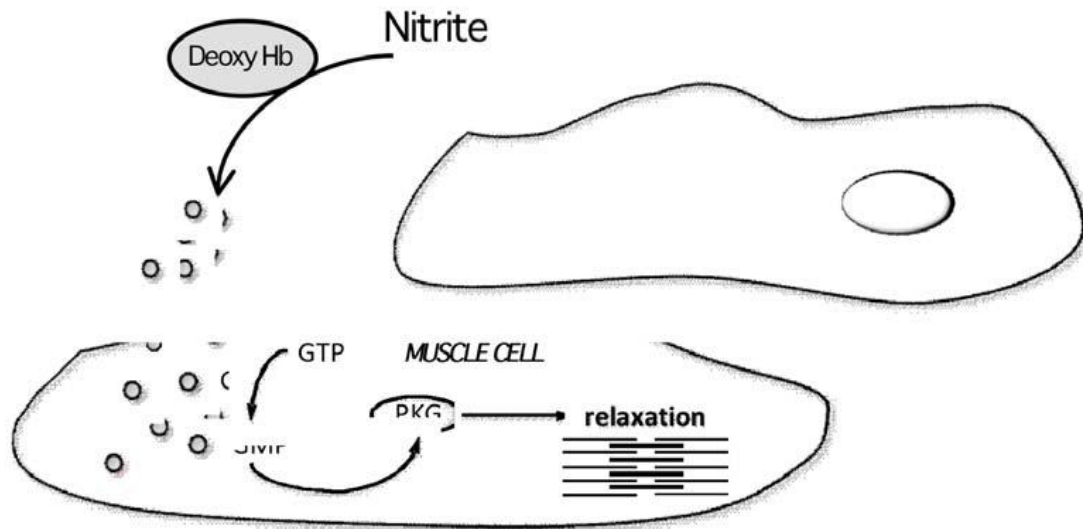


Fig. 5: Vasodilatazione indotta da nitriti nelle venule di resistenza post capillare (Tota et al., 2010).

3.1.2 Attività Nitrito reduttasica della Mioglobina e Omeostasi Redox a livello cardiaco

Nell'ultimo decennio, la mioglobina (Mb), oltre alla sua più importante funzione di legare l'ossigeno e immagazzinarlo a livello intramuscolare, è emersa (al pari dell'Hb) come importante scavenger dello NO in condizioni di normossia (Brunori 2001) ed è in grado di proteggere il cuore contro le specie azotate reattive (RNS) (Flögel et al., 2004) e di promuovere l'inibizione della formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Cutruzzolà et al., 2009; Fig. 6).

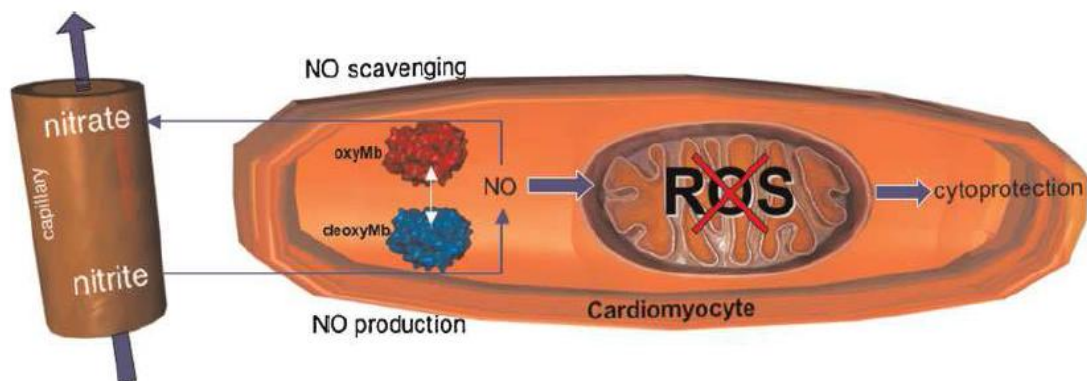


Fig. 6: L'attività nitrito reduttasica della deossiemoglobina porta alla produzione di NO che inibisce la respirazione e riduce la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Cutruzzolà et al., 2009).

Recenti studi condotti da due gruppi di ricerca indipendenti hanno dimostrato che la Mb deossigenata reagisce con i nitriti affinché venga generato lo NO bioattivo, che porta a down-regulation del consumo di ossigeno a livello miocardico (Rassaf et al., 2007; Shiva et al., 2007). La Mb agisce come uno scavenger dello NO in condizioni di normossia ed un generatore dello NO in condizioni di ipossia. Questo dinamico processo ciclico ha le potenzialità per fornire in tessuti muscolari, e in particolare nel miocardio altamente aerobico, una risposta alla mancata corrispondenza tra la domanda e l'offerta di ossigeno in seguito ad un maggiore aumento dell'attività nitrito-reduttasica dell'ossi-Mb. Il concetto innovativo che la Mb, grazie alla sua multifunzionale attività enzimatica allosterica, funge anche da sensore di ossigeno che attraverso lo NO regola le caratteristiche energetiche muscolari in condizioni di ipossia, ha conseguenze che possono essere sia fisiologicamente che clinicamente importanti. Infatti, lo NO generato dalla deossi-Mb può contribuire in modo significativo sia alla protezione cardiaca contro ischemia che alla vasodilatazione osservata durante esercizio o nella muscolatura scheletrica ipossica. In un recente lavoro di Hendgen-Cotta e collaboratori (2008), utilizzando un modello *in vitro* di cuore di topo knockout per la Mb (Mb^{-/-}, confrontato con il controllo Mb^{+/+}), è stata testata l'ipotesi che l'attività nitrito-reduttasica della deossi-Mb bioattiva protegge il miocardio esposto a una ischemia/riperfusion (I/R) attraverso la produzione dello NO. In presenza di nitriti esogeni e dopo esposizione ad un periodo di I/R, sia i cuori Mb^{+/+} e Mb^{-/-} sono stati in grado di produrre lo NO nel corso dei primi 15 min di ischemia. Tuttavia, dopo 30 min di ischemia nei cuori Mb^{+/+} i livelli dello NO risultavano aumentati, al contrario, nei cuori Mb^{-/-} erano diminuiti. La valutazione della Mb ferro-nitrosilata (MbNO) nei cuori pre-trattati con nitriti, durante e dopo ischemia ha mostrato più alti livelli di complessi eme-NO nei cuori con Mb rispetto a quelli senza Mb. Sorprendentemente, questi ultimi, rispetto ai cuori normali,

che non si sono ristabilizzati in seguito a ischemia, non presentano alcuna prova di attività nitrito-reduttasica nel tessuto infartuato. Pertanto, questi dati sono coerenti con un ruolo cito-protettivo della Mb in qualità di nitrito-reduttasi e di ossigenasi.

3.2 Xantina ossidoreduttasi è un importante nitrito-reduttasi

Tra i componenti del sistema nitrito-reduttasico, l'enzima xantina ossido reduttasi molibdoflavina è stata al centro di diversi studi (Harrison, 2002; Li et al., 2005). La xantina deidrogenasi converte la xantina ad acido urico e può essere convertita a xantina ossidasi in condizioni riducenti, come durante l'ischemia. Le massime concentrazioni di xantina ossido-reduttasi sono state trovate nel fegato, nell'intestino, nel latte materno e nel plasma di pazienti con infiammazione (Harrison, 2002). Nel cuore di ratto, l'attività della forma deidrogenasica rappresenta circa l'80% dell'attività totale dell'enzima, mentre la forma ossidasica contribuisce all'equilibrio tra le diverse forme dell'enzima (Baker et al., 2007). Cuori umani, come anche quelli di coniglio e maiale, hanno un'attività xantina-ossidasiica più bassa rispetto ai cuori di ratto, riducendo al minimo la potenziale produzione di radicali liberi a partire da metaboliti di adenosina. Ciò rende difficilmente trasferibili ad altre specie le informazioni rilevate sul ratto (Gelpi et al., 2002). In condizioni riducenti, quando la disponibilità di ossigeno ed i valori di pH sono diminuiti, i nitriti possono reagire sia con la xantina deidrogenasi che con la xantina ossidasi portando alla formazione dello NO (Zweier et al., 1994; Ferdinandy et al., 1999). Inoltre, studi condotti da Alef e collaboratori hanno dimostrato l'importanza dell'attività di questo enzima negli effetti vaso-protettivi mediati dai nitriti: la concentrazione dell'enzima è aumentata in seguito a lesioni della parete vasale, suggerendo che la riduzione dei nitriti mediata dalla xantina ossido reduttasi è una

risposta adattativa importante per aumentare la produzione arginina/NOS-indipendente dello NO (fig. 7).

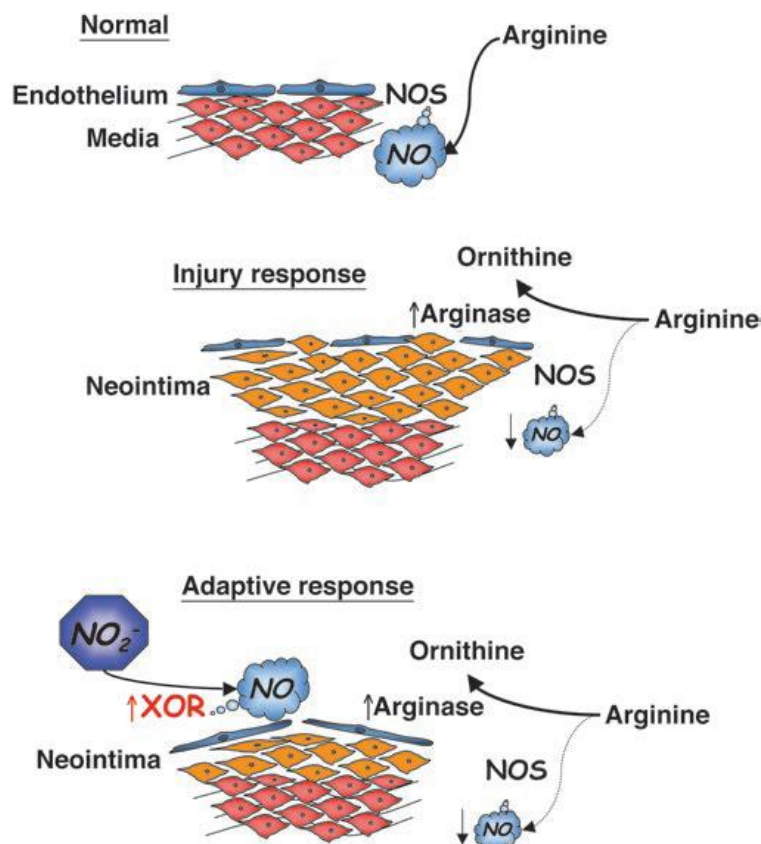


Fig. 7: Rappresentazione schematica di produzione dello NO in condizioni normali e in seguito a danno vascolare. In condizioni fisiologiche, l'e-NOS utilizza L-arginina per produrre lo NO. In seguito a danno vascolare, un'aumentata quantità di arginasi compete con L-arginina come substrato e comporta una diminuzione della produzione dello NO NOS-dipendente. Come risposta adattativa, la xantina ossidasi riduce i nitriti ad NO contribuendo così a limitare il danno vascolare. (Alef et al., 2011).

4. Effetti vasali mediati dai nitriti

L'azione vasoattiva esercitata dai nitriti è nota da tempo (Furchgott e Bhadrakom, 1953). Ignarro e collaboratori (1980) hanno documentato l'abilità vasodilatatoria dei nitriti sulle arterie coronariche di mammifero utilizzando preparati *in vitro* e Murad e collaboratori (1987) hanno dimostrato che questa influenza vasodilatante è cGMP-dipendente. Tuttavia, questo effetto è stato a lungo ritenuto non fisiologico, poiché numerosi studi lo hanno evidenziato solo a concentrazioni relativamente alte (100 μ M - 1 mM), mentre le concentrazioni circolanti di nitriti sono inferiori ad 1 μ M (Kimura et

al., 1975; Arnold et al., 1977). Tuttavia, negli ultimi dieci anni, studi rivolti ad esplorare le azioni endocrine mediate dallo NO non solo in qualità di agente paracrino, hanno fornito le basi per identificare i nitriti sia come la più grande riserva vascolare dello NO che un importante vasodilatatore fisiologico (Lundberg et al., 2008). Il meccanismo alternativo di produzione dello NO a partire dai nitriti è stato riscontrato soprattutto in condizioni di ipossia e di acidosi quando l'attività delle NOSs è fortemente ridotta (Duranski et al., 2005; Webb et al., 2004). E' stato osservato che la formazione dello NO a partire dai nitriti, nei tessuti biologici, può aumentare fino a circa 100 volte al variare del pH (Benjamin et al., 1994). Ad esempio, in condizioni di acidosi (pH 6,6) o in presenza di ascorbato i nitriti presentano una potente azione vasodilatatoria anche a basse concentrazioni (Modin et al., 2001). Studi su volontari umani hanno dimostrato che l'effetto vasodilatatorio dello NO può essere evidenziato a lunga distanza ed anche in presenza di inibizione delle NOSs; in questi casi l'effetto vasodilatatorio riscontrato risulta essere associato alla presenza di nitriti (Rassaf et al., 2002; Cannon et al., 2001). Sulla base di queste osservazioni e soprattutto sui numerosi studi anche umani effettuati presso il National Institute of Health (NIH) da Gladwin e collaboratori (2000) è stato proposto che questi anioni rappresentano la più grande riserva intravascolare dello NO che viene utilizzata anche a livello periferico soprattutto quando c'è carenza nella produzione dello NO. In uno studio successivo, Cosby e collaboratori (2003) hanno testato direttamente la vasodilatazione nitrito-dipendente somministrando basse concentrazioni di nitriti nell'arteria brachiale di 28 volontari umani sani in cui sono stati misurati i cambiamenti nel flusso ematico. I risultati di questi esperimenti hanno mostrato che, in condizioni di riposo, anche in presenza di inibizione delle NOSs c'è stato un aumento del flusso sanguigno. In seguito ad un intenso esercizio fisico durante il quale diminuisce sia il pH che la P_{O_2} , l'aumento del flusso di sangue provocato dai

nitriti era superiore a quello dei soggetti a riposo. I risultati dello studio di Cosby e collaboratori (2003) assumono particolare importanza in quanto dimostrano che i nitriti agiscono come agenti vasodilatatori anche in condizioni fisiologiche. Un altro risultato interessante è stato che la vasodilatazione nitrito-dipendente è associata ad una maggiore produzione di ferro-nitrosil-Hb e una minore produzione di S-nitroso-Hb aprendo la strada a una riconsiderazione generale del ruolo delle proteine eme (Cosby et al., 2003).

5. Effetti cardiaci mediati dai nitriti

5.1 Protezione nitriti-mediata contro danni da ischemia/riperfusion

Sebbene modificazioni specie-specifiche possono essere presenti nella struttura del tessuto cardiaco dei mammiferi, comunemente, i cardiomiociti rappresentano gli obiettivi più sensibili a lesioni da I/R (Jennings e Reimer, 1991). Tra i vari processi citotossici indotti da I/R, il danno ossidativo causato dai ROS svolge un ruolo importante in particolare durante la fase di riperfusione. La produzione accresciuta di ROS dopo riperfusione post-ischemica induce lesioni e necrosi miocardica causate da un mancato equilibrio tra le quantità di calcio intracellulare e il danno mitocondriale con attivazione della cascata apoptotica (Gottlieb et al., 1994). In condizioni di I/R, lo NO mostra un effetto bifasico: ad alte dosi (concentrazioni non fisiologiche) può aggravare il processo citotossico, al contrario, a concentrazioni fisiologiche esercita un effetto cardioprotettivo (Bolli, 2001; Jones et al., 2006). Lo NO esercita il suo effetto cardioprotettivo tramite attivazione dei canali mitocondriali K_{ATP} , che contrastano la fuoriuscita del citocromo c attraverso lo spazio intermembrana, prevenendo l'apoptosi (Korge et al., 2002). Al pari dello NO, anche i nitriti esercitano un effetto protettivo in diversi modelli di I/R (Hendgen-Cotta et al., 2008; Jung et al., 2006). Nel ratto, sia in

cuori perfusi secondo la metodica *Langendorff* (Webb et al., 2004) che modelli di infarto del miocardio *in vivo* (Duranski et al., 2005), concentrazioni micromolari di nitriti sono in grado di limitare i danni cardiaci in seguito a I/R, effetto che viene abolito in seguito a somministrazione di uno scavenger dello NO, lo PTIO. Recentemente è stato documentato che i nitriti migliorano la perfusione cardiaca microvascolare e l'attività contrattile riducendo le dimensioni dell'area infartuata e l'apoptosi, e ciò supporta l'idea che i nitriti sono una riserva bioattiva intravascolare dello NO responsabile della cardioprotezione (Gonzales et al., 2008). È interessante notare come, utilizzando modelli *in vivo* e *in vitro* di danno miocardico in seguito a I/R, Baker e collaboratori (2007) hanno confermato che i nitriti, ma non il nitrato, esercitano cardioprotezione (riduzione della necrosi miocardica e della disfunzione ventricolare) e che questo effetto è NOS-indipendente, ma richiede il coinvolgimento della xantina ossidoreduttasi, NADPH ossidasi e canali mitocondriali K_{ATP} (Webb et al., 2004). L'evidenza sperimentale che l'inibizione della riduzione dei nitriti guidata dal NADH attraverso la apocinina (Miyagawa et al., 2007), un inibitore della NADPH ossidasi, ha abolito la cardioprotezione indotta da nitriti, evidenzia l'identificazione di un nuovo e potenzialmente importante meccanismo mediante il quale i nitriti possono conferire cardioprotezione. Shiva e collaboratori (2007) hanno dimostrato che l'esposizione acuta e ritardata (24 h prima dell'ischemia) a concentrazioni fisiologiche dei nitriti, somministrate sia sistemicamente che per via orale, limita potentemente il danno da riperfusione sia a livello epatico che cardiaco. Questa citoprotezione è associata ad aumenti della fosforilazione ossidativa mitocondriale. In particolare, i nitriti in maniera dose-dipendente inibiscono e modificano il complesso I della catena respiratoria attraverso S-nitrosazione post-traslazionale. Questo diminuito trasferimento degli elettroni riduce la generazione dei ROS e migliora l'inattivazione ossidativa del

complesso II-IV e l'aconitasi, prevenendo così il rilascio di citocromo c e l'apertura dei canali mitocondriali (Shiva et al., 2007; fig. 8).

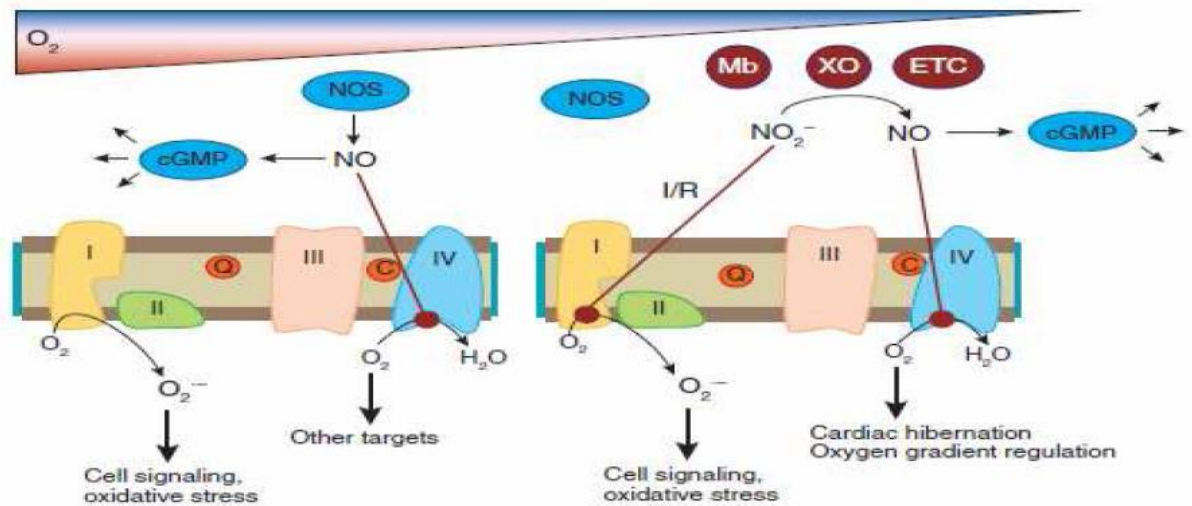


Fig. 8 : Interazioni dei nitriti e dello NO con i mitocondri. In condizioni di normossia le NOSs generano lo NO che attiva il pathway del cGMP e inibisce direttamente il complesso IV. Questo permette all'ossigeno di essere distribuito ad altri targets. Questa inibizione inoltre aumenta la generazione di ROS dai mitocondri che mediano stress ossidativo. In condizioni di ipossia/ischemia l'attività delle NOSs è inibita dalla perdita di ossigeno. I nitriti sono ridotti ad NO dalla deossi-Mb, dalla xantina ossido reduttasi, e da altri enzimi e lo NO che viene prodotto può inibire la respirazione sul complesso IV per regolare il gradiente di ossigeno. Durante I/R i nitriti inibiscono il complesso I attraverso la S-nitrosilazione, che diminuisce la generazione di ROS durante la riperfusione, con conseguente citoprotezione (Lundberg et al., 2009).

5.2 Modulazione dell'inotropismo cardiaco: un quadro comparato

L'influenza dei nitriti sulla performance basale cardiaca in condizioni fisiologiche è stata scarsamente investigata anche se alcuni studi confermano l'idea che i nitriti siano una fonte fisiologica e basilare dello NO ed un'importante molecola segnale nel cuore dei mammiferi. Recentemente, è stato esplorato questo aspetto utilizzando tre diversi modelli di cuore di vertebrati: il ratto (Pellegrino et al., 2009), la rana e due teleostei (Cerra et al., 2009) come rappresentanti dei mammiferi, anfibi e pesci, rispettivamente. Nel cuore di ratto isolato e perfuso secondo *Langendorff* (buffer normossico), livelli fisiologici di nitriti (10 nM) modulano la contrattilità cardiaca, esercitando un effetto inotropo e lusitropico negativi (rispettivamente effetto contrattile e rilassamento) analogamente agli effetti inotropi negativi osservati in seguito a perfusione con L-arginina, substrato fisiologico per le NOSs, nonché con donatori dello NO esogeni. È importante sottolineare che questi effetti, anche se indipendenti dall'attività delle NOSs, sono cGMP/PKG-dipendente e sensibili all'azione di NO-scavenger. Inoltre i cuori trattati con i nitriti contengono concentrazioni più alte di nitriti e concentrazioni significativamente più alte di S-nitrosotiole e proteine ferro-nitrosilate in confronto ai cuori controllo. Nel complesso questi dati indicano che in cuori di ratto i nitriti sono ridotti ad NO attivo attraverso delle proteine cardiache contenenti un gruppo eme, e sono in grado di modulare la contrattilità miocardica attraverso la via NO-cGMP/PKG (Pellegrino et al., 2004; 2009). Nei vertebrati non mammiferi i dati sulla azione diretta cardiaca dei nitriti sono ancora più carenti. Cerra e collaboratori (2009) hanno valutato l'influenza dei nitriti sulla performance cardiaca basale di tre differenti vertebrati a sangue freddo, due pesci teleostei, *Anguilla anguilla*, e *Chionodraco hamatus* (icefish, pesce antartico natural knockout per la emoglobina), e l'anfibio *Rana esculenta*. Sia anguilla che rana sono animali esposti a notevoli fluttuazioni di ossigeno, in particolare,

il primo è un esempio importante di animale in grado di tollerare condizioni di ipossia prolungata e acidosi. In contrasto, l'icefish, un caso unico di estrema stenotermia, è adattato in un ambiente estremamente stabile, le acque antartiche, stabilmente ghiacciate e riccamente ossigenate, che hanno consentito la sopravvivenza questi di organismi nonostante la loro perdita evolutiva di Hb e globuli rossi, normalmente indispensabile per la vita dei vertebrati (Tota et al., 1991; Cheng e Detrich, 2007). Gli studi su questi organismi con un miocardio prettamente avascolare assumono particolare importanza in quanto permettono di conoscere le influenze esercitate dai nitriti sulla contrattilità miocardica indipendentemente da interazioni vascolari. In tutte e tre queste specie, in condizioni basali, i nitriti influenzano la performance del miocardio, negativamente con diminuzione della gittata sistolica in anguilla e rana e positivamente con aumento della gittata sistolica in icefish (Cerra et al., 2009). E' interessante notare che gli effetti indotti dai nitriti in queste specie sono comparabili a quelli ottenuti in seguito all'esposizione diretta dello NO [anguilla (Imbrogno et al., 2001), icefish (Pellegrino et al., 2004), rana (Gattuso et al., 1999)], e forniscono un esempio lampante del ruolo della produzione di NO nitrito-dipendente nel cuore. In zebrafish, l'esposizione a nitriti (0,6-2 mM) induce un aumento dei livelli di Hb-NO conseguente ad un'aumentata produzione dello NO inducendo notevoli effetti cardiovascolari (vasodilatazione e diminuzione della pressione sanguigna), subito contrastata da un aumento dell'attività cardiaca (Aggergaard e Jensen, 2001). Pertanto, anche nei cuori dei bassi vertebrati i nitriti rappresentano una fonte fisiologica dello NO ed esercitano un'azione contrattile rilevante attraverso meccanismi specie-specifici.

5.2.1 Modulazione nitregica del meccanismo di Frank-Starling

Il meccanismo di Frank-Starling è una proprietà intrinseca del tessuto cardiaco di tutti i vertebrati. E' stato riscontrato sia nel miocardio adulto che embrionale (Åsnes et al., 2006) e descrive come un aumento della lunghezza delle fibre muscolari (stretch) è in grado di aumentare la contrattilità (Allen e Kentish, 1985). Questo meccanismo è vitale per compensare battito per battito le variazioni del ritorno venoso con variazioni del volume di sangue pompato dal ventricolo: un aumento del ritorno venoso dilata il ventricolo, la distensione del miocardio comporta un aumento della contrattilità del muscolo con conseguente aumento della gittata sistolica. Perciò, il meccanismo di Frank-Starling è centrale per la regolazione della gittata cardiaca (Lillywhite et al., 1999). Nei mammiferi, i meccanismi alla base della risposta di Frank-Starling sono stati estesamente analizzati. In preparati di miocardio isolato, è stato dimostrato che le variazioni della lunghezza iniziale del muscolo influenzano il livello di attivazione dei miofilamenti (attivazione lunghezza-dipendente) (Parmley e Chuck, 1973; Fabiato e Fabiato, 1975; Lakatta e Jewell, 1977; Allen e Kurihara, 1982). Per spiegare questi effetti, sono stati proposti diversi pathway cellulari come la variazione della reattività delle proteine contrattili regolate dal Ca^{2+} , le alterazioni della concentrazione intracellulare del Ca^{2+} , le modificazioni dell'attività dell'inositotrilfosfato e della protein-chinasi C, e l'apertura di canali ionici stretch-attivati (Gordon et al, 2001). Nei mammiferi, lo stretch favorisce un aumento del rilascio dello NO sia da parte dell'endotelio vascolare che dai cardiomiociti facilitando il rilassamento del miocardio, la distensibilità ventricolare diastolica e quindi la risposta di Frank-Starling (Pinsky et al., 1997; Petroff et al., 2001; Balligand et al., 2009). Come nei mammiferi, anche nei pesci l'aumento del volume telediastolico e il conseguente stretch è un regolatore chiave della performance cardiaca, anzi, a differenza dei mammiferi, nei pesci questo

meccanismo assume particolare importanza in quanto questi organismi rispondono a carichi emodinamici crescenti principalmente attraverso un aumento della gittata sistolica piuttosto che ad un aumento di frequenza cardiaca (Tota e Gattuso, 1996). Questa elevata sensibilità dei cuori di pesce alla risposta di Frank-Starling, ben documentata in diverse specie (*Orata orata*, Icardo et al., 2005; *Anguilla anguilla*, Imbrogno et al., 2001; *Chionodraco hamatus*, Tota et al., 1991), è stata attribuita in parte ad una maggiore distensibilità delle fibre miocardiche tipica dei cuori altamente trabecolati (Di Maio e Block, 2008; Shiels e White, 2008). È interessante notare che nel cuore di anguilla è stato riscontrato un rilascio basale dello NO che aumenta la sensibilità della risposta di Frank-Starling (Imbrogno et al., 2001). La produzione intracardiaca basale dello NO, in seguito ad aumenti del precarico, è stata confermata anche nei mammiferi. Infatti, in guinea pig, questo aumento dello NO stretch-dipendente influenza marcatamente la risposta cardiaca tramite cambiamenti della sensibilità dei miofilamenti al Ca^{2+} e questo effetto è significativamente attenuato sia in presenza di L-NMMA che di Hb, che inibiscono la produzione basale e l'attività dello NO rispettivamente (Prendergast et al., 1997). In *Anguilla anguilla*, concentrazioni esogene di questo radicale influenzano la risposta di Frank-Starling attraverso l'attivazione PI-3-chinasi-mediata della eNOS e una modulazione delle pompe $SR-Ca^{2+}$ ATPasi (Garofalo et al., 2009). Garofalo e collaboratori (2009) hanno inoltre dimostrato, per la prima volta, che la modulazione nitrergica della risposta di Frank-Starling di cuori di bassi vertebrati agisce attraverso l'attivazione della produzione dello NO e-NOS-dipendente e Akt-mediata ed è in grado di modulare il reuptake di Ca^{2+} attraverso S-nitrosilazione del fosfolambano e quindi il rilassamento del miocardio. In entrambi i vertebrati, mammiferi e non mammiferi, lo NO derivante sia dall'endotelio vascolare che dai

cardiomiociti, facilita il rilassamento miocardico, la distensibilità ventricolare diastolica e quindi la risposta di Frank-Starling (Prendergast et al., 1997; Garofalo et al., 2009).

6. S-nitrosilazione

Accanto all'attivazione di pathways trasduzionali cGMP-dipendenti, lo NO è in grado di modificare direttamente l'attività di diverse proteine tramite modificazioni post-traduzionali di gruppi tiolici (Seth e Stamler, 2011; Sun e Murphy, 2010). Questa modificazione post-traduzionale, denominata S-nitrosilazione o S-nitrosazione (SNO), prevede il legame covalente tra lo NO e il gruppo tiolico di una cisteina con formazione di un nitrosotiole (RSNO) (Myers et al., 1990; Stamler et al., 1992). Gow e collaboratori (1997) inoltre hanno proposto un meccanismo alternativo di formazione degli S-nitrosotiole: lo NO reagisce con i tiole per produrre degli intermedi radicalici RSNO-H che poi possono ridurre un accettore di elettroni per produrre RSNO. In condizioni di normossia, è l'ossigeno molecolare che si riduce ad anione superossido (O_2^-) ed agisce da accettore di elettroni. Questo meccanismo quindi può rendere conto della S-nitrosilazione che non avviene solo in condizioni di acidosi, ma anche in condizioni fisiologiche, quando è presente una normale ossigenazione dei tessuti (Pryor et al., 1981; 1982).

La formazione di RSNOs *in vivo* è responsabile di molti processi fisiologici: nel sistema vascolare la formazione di S-nitroso glutatione (GSNO) porta a vasodilatazione ed inibizione dell'aggregazione piastrinica (Ignarro et al., 1981); lo stesso effetto è prodotto dalla S-nitroso emoglobina (SNO-Hb) (Stamler et al., 1997; Pawloski et al., 1998).

Diversi studi hanno dimostrato che la S-nitrosilazione gioca un ruolo importante nella regolazione di molte funzioni cellulari alterando l'attività e la stabilità delle proteine o la

localizzazione cellulare. Ad esempio, questa reazione è coinvolta nell'accoppiamento eccitazione-contrazione, nella cardioprotezione, e nella regolazione dei recettori accoppiati a proteine G (Whalen et al., 2007). Un gran numero di proteine, in particolare canali ionici, sono stati identificati come target di nitrosilazione attraverso cui viene modulata la loro attività e/o la loro funzionalità (Sun et al., 2007; 2006; Eu et al., 2000). Tuttavia, alcune delle modificazioni indotte da questa reazione sono irreversibili e potenzialmente nocive, quali ad esempio la nitratura della tirosina o l'ossidazione della metionina (Hess et al., 2005).

Analogamente alla fosforilazione e ad altre modificazioni post-traduzionali, la S-nitrosilazione rappresenta un importante meccanismo regolatorio delle funzioni cellulari. Inoltre, può proteggere i residui di cisteina modificati dall'ossidazione irreversibile. La reazione di S-nitrosilazione è stimolo-mediata, ma può anche essere avviata dall'attivazione delle NOS. Oltre alla nitrosilazione però bisogna ricordare anche la reazione di transnitrosilazione cioè il trasferimento di un gruppo NO da un tiolo ad un altro (Arnelle et al., 1997; Liu et al., 1998). Infatti la S-nitrosilazione dei residui di cisteina può avvenire anche per trasferimento di gruppi NO da molecole di basso peso molecolare come il glutatione (Martinez-Ruiz e Lamas, 2004), che nella forma nitrosilata è noto come GSNO e che rappresenta il substrato principale dell'enzima S-nitroso glutatione reduttasi (GSNOR). La GSNOR metabolizza il GSNO a glutatione ossidato (GSSG) e l'intermedio N-idrossisulfenammide che a sua volta viene ridotto ad ammonio. Topi knockout per la GSNOR mostrano un aumento delle concentrazioni di S-nitrosotoli, che dimostra come il rapporto GSNOR/GSNO sia importante nel mantenimento dell'omeostasi degli S-nitrosotoli (Foster et al., 2009).

6.1 S-nitrosilazione a livello cardiaco

La S-nitrosilazione delle proteine cardiache è attualmente al centro di numerosi studi anche se ancora non sono stati individuati tutti i possibili targets. Tramite un approccio proteomico, Shi e collaboratori (2008) hanno individuato come target di S-nitrosilazione una serie di enzimi metabolici coinvolti nell'apporto energetico che svolgono un ruolo critico nella funzione cardiaca. Tra questi GAPDH, albumina, actina, creatina chinasi e Hsp27 (Shi et al., 2008). Anche numerosi canali ionici sono stati individuati come targets di S-nitrosilazione. Sun e collaboratori (2006) hanno dimostrato che la subunità $\alpha 1$ del canale L-type per il Ca^{2+} è la proteina maggiormente S-nitrosilata nelle frazioni di membrana. La S-nitrosilazione di queste proteine, nel cuore, avviene in modo endogeno *in vivo* e i livelli di S-nitrosilazione sono significativamente aumentati dopo stimolazione β -adrenergica e I/R e questo aumento è significativamente superiore nelle femmine rispetto ai soggetti di sesso maschile (Sun et al., 2006). Il trattamento con isoproterenolo prima di I/R si traduce in maggiori livelli di S-nitrosilazione dei canali L-Type per il Ca^{2+} , minore danno ischemico, e maggiore recupero funzionale dopo riperfusione nelle femmine (Zhang et al., 2005). È stato precedentemente dimostrato che i composti SNO potrebbero poli-S-nitrosilare e attivare i canali RyR2 *in vitro* (Xu et al., 1998). Inoltre, Petroff e collaboratori (2001) hanno riportato che lo stretch della muscolatura cardiaca modula il rilascio di Ca^{2+} da RyR2, e la stimolazione di Ca^{2+} attraverso l'attivazione di PI3K/Akt/eNOS. Lo NO così prodotto esercita una azione cGMP-indipendente molto probabilmente attraverso la S-nitrosilazione del RyR2 o uno dei suoi componenti regolatori (Petroff et al., 2001). Di recente, è stato proposto un duplice ruolo nell'attivazione delle pompe SERCA2a da parte dello NO: la S-nitrosilazione reversibile mediata da glutatione sulla Cys674 e la formazione di perossinitrito (Adachi et al., 2004). Elevati livelli di stress ossidativo in alcuni stati patologici

cronici, come l'aterosclerosi, potrebbero irreversibilmente ossidare i tioli bersaglio e bloccare la S-nitrosilazione reversibile mediata da glutatione NO-indotta (Adachi et al., 2004).

6.1.1 I canali ionici per il K⁺ “inwardly rectifier”

Numerose cellule, tra cui cardiomiociti, possiedono i canali ionici per il potassio (K⁺) chiamati “inwardly rectifier” o più comunemente noti con il nome di canali Kir o IRK, costituiti da 4 subunità ognuna delle quali è formata da 2 segmenti transmembrana (Nichols e Lopatin, 1997). Questi canali sono coinvolti nel mantenimento del potenziale di membrana a riposo vicino al potenziale d'equilibrio dello ione K⁺, nella regolazione della durata del potenziale d'azione e nel controllo dell'eccitabilità di numerose cellule (Hagiwara e Takahashi, 1974). Esistono 3 tipi di canali Kir denominati rispettivamente Kir 2.1, Kir 2.2 e Kir 2.3, che contribuiscono alla creazione di correnti I_{K1} (Wang et al., 1998). Tra questi, i Kir 2.1 sono quelli maggiormente implicati nella genesi di correnti inward nella cellula cardiaca. Le correnti I_{K1} permettono una maggiore conduttanza inward, cioè diretta verso l'interno della cellula, quando il valore del potenziale di membrana è al di sotto del potenziale del K⁺ ed una maggiore conduttanza outward, diretta cioè verso l'esterno della cellula, quando il valore del potenziale di membrana è al di sopra del potenziale del K⁺ (Lopatin e Nicholson, 2001). La conduttanza dei canali Kir 2.1 dipende molto anche dalle concentrazioni di K⁺ extracellulari (Lopatin e Nichols, 2001 e referenze). Alterazioni delle funzioni o della struttura di questi canali sembrano essere alla base di patologie come la sindrome da QT lungo o sindrome di Tawil e da QT corto o sindrome di Andersen (Morita et al., 2008). Entrambe queste sindromi sono associate ad aritmie ventricolari (Noujaim et al., 2007). Alcuni ricercatori hanno dimostrato come lo NO sia implicato nel diminuire il potenziale di riposo della

membrana e accorciare la durata di un potenziale d'azione (Gomez et al., 2009). Studi condotti attraverso l'utilizzo di donatori dello NO come SNAP e DEANO hanno dimostrato come lo NO possa regolare l'eccitabilità cardiaca attraverso la S-nitrosilazione di una cisteina in posizione 76 del canale Kir 2.1 (Gomez et al., 2009). La nitrosilazione porta ad un aumento sia delle correnti di tipo inward che outward. Dati in letteratura mostrano che il pathway trasduzionale sGC/cGMP/PKG, meccanismo con cui agisce principalmente lo NO (Schulz et al., 2005), non è coinvolto nella regolazione delle correnti I_{K1} . L'uso contemporaneo di un donatore dello NO e di un agente riducente, invece diminuisce le correnti attraverso i Kir 2.1. Questo confermerebbe che una modificazione post-trasduzionale importante che regola l'attività di questi canali è la S-nitrosilazione (Gomez et al., 2009).

MATERIALI E METODI

1 Metodica Langendorff

Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando, come modello sperimentale, il preparato di cuore di ratto isolato e perfuso secondo la metodica *Langendorff*. Si tratta di una metodica che, grazie alle condizioni di perfusione che riflettono molto da vicino l'emodinamica cardiaca dell'animale *in vivo*, si presta agevolmente a studi fisiofarmacologici. I vantaggi sostanziali di questo modello sperimentale consistono nella possibilità di valutare gli effetti cardiovascolari diretti di numerose sostanze in termini di funzione contrattile, di attività elettrica e di funzione metabolica; nella possibilità di eseguire studi di dosaggio dei farmaci in modo rapido e con esatto controllo delle concentrazioni; nella possibilità di sospendere la somministrazione della sostanza in esame intercambiando i fluidi di perfusione (Cerra et al., 2006). Inoltre, il preparato permette di condurre studi sulla risposta cardiaca in seguito a variazioni del flusso coronarico, sulla reattività vascolare, sulla funzionalità dell'endotelio e del muscolo liscio (Cerra et al., 2006).

1.1 Animali

Gli esperimenti, autorizzati dal Ministero della Sanità (Roma, Italia) e regolati dal decreto legislativo 116 del 1992, sono stati realizzati adoperando ratti maschi del ceppo Wistar, dal peso di 180-250 g, forniti dalla Harlan Laboratories s.r.l. (Udine, Italia). Al loro arrivo, al fine di consentire un completo recupero dallo stress conseguente al trasporto, gli animali sono stati stabulati per almeno quattro giorni in un ambiente climatizzato, con temperatura costante di circa 25°C, illuminato artificialmente per cicli di 12 ore consecutive. Inoltre, i ratti sono stati alimentati *ad libitum* e sacrificati entro massimo venti giorni dal loro arrivo.

1.2 Apparato di perfusione

La metodica *Langendorff* si avvale di un apparato costituito da un serbatoio, contenente la soluzione di perfusione *Krebs-Henseleit*, una pompa peristaltica, una trappola per bolle, un bagno termoregolatore ed un sistema di acquisizione dati con interfaccia McLab (fig. 9). Uno stimolatore bipolare (Panlab LE 12106), il cui elettrodo viene posizionato a livello dell'atrio destro del cuore, impostato in modo da dettare una frequenza di stimolazione di 340 battiti al minuto, ad un voltaggio di 10 V per una durata di 2 ms, è usato per mantenere una frequenza costante durante gli esperimenti. La pompa peristaltica ha il compito di prelevare la soluzione di perfusione dal serbatoio e di spingerla, attraverso una serie di tubi, nella trappola per bolle, la quale evita la formazione di emboli che potrebbero danneggiare il cuore e falsare il risultato degli esperimenti. Il perfusato raggiunge quindi il cuore attraverso una cannula inserita direttamente nell'aorta.

La temperatura ideale di perfusione (37-37,5°C) viene mantenuta da un sistema di termostatazione che controlla tutti i serbatoi contenenti la soluzione fisiologica, la camera che contiene il cuore ed i vari tubi che compongono l'apparato (Cerra et al., 2006). La costanza della temperatura è garantita da un bagno termoregolatore a circolazione esterna, capace di evitare cadute di temperatura lungo l'intero apparato (Cerra et al., 2006).

L'apparato è dotato anche di due trasduttori (Model BLPR, cod 18700), che registrano la pressione del ventricolo sinistro e la pressione coronarica. I quali sono collegati al sistema di acquisizione dati McLab a sua volta collegato ad un computer (Pentium III, Hewlett Packard Brio).

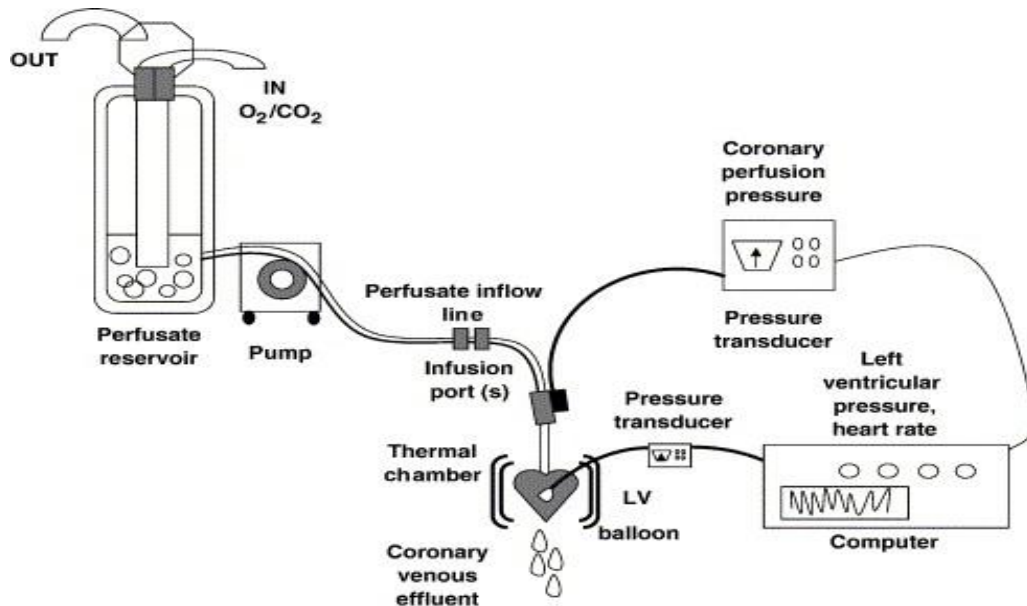


Fig. 9: Rappresentazione schematica dell'apparato di perfusione.

1.3 Perfusione e composizione del perfusato

Nella metodica di *Langendorff* la perfusione è condotta in senso retrogrado a flusso costante di $10\text{-}13,5\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ per grammo di cuore fresco (Legssyer et al., 1997; Doring, 1990); in questo modo, la valvola aortica viene chiusa forzatamente ed il fluido di perfusione, attraverso le coronarie, perfonde l'intera massa cardiaca e drena, mediante il seno coronario, nell'atrio destro (Sutherland et al., 2000).

La soluzione di perfusione è un tampone bicarbonato, detto *Krebs-Henseleit* (Legssyer et al., 1997; Doring, 1990), modificato rispetto alla formulazione originaria nella concentrazione di ioni calcio, che è stata ridotta (Cerra et al., 2006). La composizione completa del perfusato è la seguente (mM): NaCl 113, KCl 4.7, NaHCO_3 25, MgSO_4 1.2, CaCl_2 1.8, KH_2PO_4 1.2, glucosio 11, mannitolo 1.1, Na-piruvato 5.

Nella preparazione del tampone Krebs-Henseleit sono indispensabili alcuni accorgimenti che servono a garantirne un'adatta qualità. In particolare, bisogna aggiungere il componente calcio solo alla fine della procedura, per evitare la

precipitazione dei suoi sali; è necessario filtrare la soluzione con membrane di cellulosa da 0,8 micron, per rimuovere possibili impurità; occorre mantenere il pH ad un valore ottimale di 7.4, attraverso la continua ossigenazione con una miscela di O₂ (95%) + CO₂ (5%) sempre per impedire la precipitazione dei sali di calcio. Il continuo rifornimento di O₂ è, inoltre, indispensabile a supportare il normale metabolismo tissutale, per mantenere il gradiente trans-membrana e per garantire la funzione contrattile cardiaca (Sutherland et al., 2000).

Dal punto di vista metabolico, il cuore perfuso utilizza il glucosio come unico substrato energetico per sopperire alla mancanza degli acidi grassi che, sebbene *in vivo* siano la sorgente primaria di energia, non possono essere utilizzati nel preparato sia perchè sono insolubili in acqua sia perchè danno effetti schiumogeni se sottoposti all'azione di gas (Sutherland et al., 2000).

Alla soluzione di perfusione possono, poi, essere aggiunte le sostanze che si desidera testare.

1.4 Dissezione, isolamento ed incannulazione del cuore

Prima di procedere all'isolamento del cuore, l'animale viene anestetizzato mediante iniezione intraperitoneale di carbammato di etile (2g/Kg).

Dopo aver verificato la completa assenza di riflessi nell'animale, si effettua un'incisione trans-addominale che consente di evidenziare la cavità toracica; il torace viene, così, aperto attraverso un taglio bilaterale lungo il margine inferiore dalle ultime alle prime costole e la gabbia toracica viene sollevata esponendo il cuore. L'organo è espantato dopo recisione dell'aorta, della vena cava e dei vasi polmonari, per essere subito immerso in un beaker contenente la soluzione di perfusione, mantenuta a 4°C, al fine di evitare danni ischemici (Cerra et al., 2006). Successivamente, l'aorta viene incannulata

per iniziare la perfusione retrograda a flusso costante (fig. 10); generalmente, con la pratica, l'intervallo di tempo che intercorre tra l'espianto e l'incannulazione non supera i 30 secondi (Cerra et al., 2006).

La cannula di perfusione aortica presenta un diametro esterno di 1,8 mm, per il cuore di un ratto di 250 g, e può essere realizzata in vetro, plastica o acciaio inossidabile (Cerra et al., 2006).

Per ridurre al minimo la possibilità che si formino bolle al momento dell'incannulazione, la soluzione di perfusione viene opportunamente fatta gocciolare dalla cannula già prima che il cuore venga collegato attraverso l'aorta e fissato mediante una legatura con filo di seta (Cerra et al., 2006).

Dopo aver saldamente fissato il cuore, viene praticata una piccola incisione a livello dell'arteria polmonare, che potrebbe essere accidentalmente legata durante l'incannulazione, in modo da facilitare un adeguato drenaggio (Cerra et al., 2006); inoltre, per prevenire l'accumulo di perfusato nel ventricolo sinistro, viene effettuato nell'apice ventricolare un piccolo foro mediante l'ausilio di un ago.

Quando l'incannulazione è completata e la perfusione è cominciata, affinché il cuore si stabilizzi completamente sono richiesti almeno 10 minuti (Cerra et al., 2006).

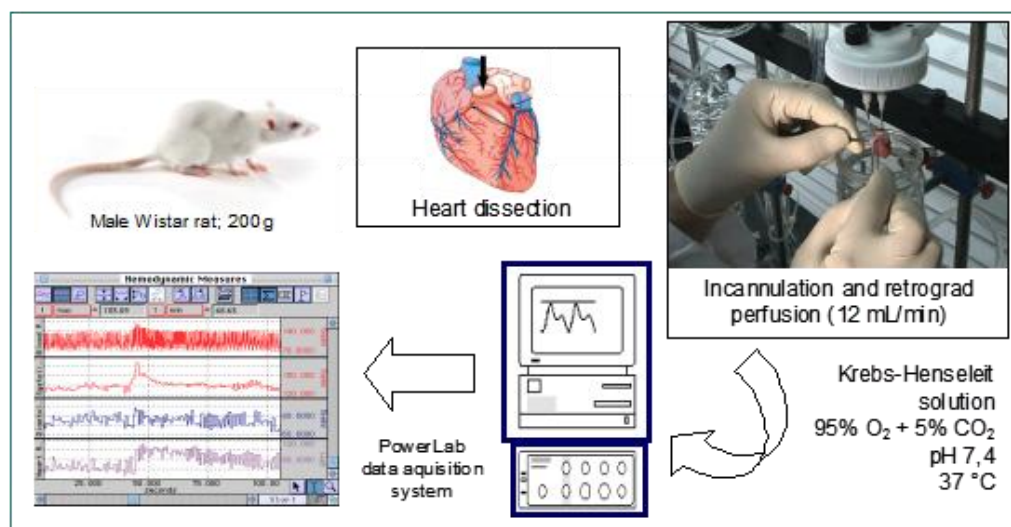


Fig. 10: Isolamento e incannulazione del cuore di ratto perfuso per via retrograda con soluzione KHs.

1.5 Misurazione dell'attività contrattile del cuore

Nel corso dell'esperimento, sia per ottenere informazioni circa l'azione delle sostanze testate, sia per monitorare la stabilità del cuore e riscontrare eventuali aritmie, vengono costantemente misurati particolari parametri dell'attività cardiaca.

Di fondamentale importanza è la valutazione dell'attività contrattile, la cui misurazione prevede l'utilizzo di un palloncino in lattice, collegato ad un trasduttore di pressione (Modello BLPR, cod 18700), che viene collocato nel ventricolo sinistro (Cerra et al., 2006).

L'atrio sinistro viene rimosso per facilitare l'inserimento del palloncino nella cavità ventricolare attraverso la valvola mitrale; una volta posizionato, esso viene gonfiato con acqua distillata mediante una microsiringa (Hamilton 250 μ L), in modo da regolarne il volume.

I palloncini sono utilizzati solo se ad un volume di 80-100 μ L generano una pressione inferiore a 3 mm Hg (Cerra et al., 2006). Il loro volume viene aumentato con incrementi graduali di 20 μ L, finché la pressione generata raggiunge un plateau, di circa 5 mm Hg, corrispondente al lavoro isovolumetrico del cuore (Bartfly et al., 1999). Volumi eccessivi potrebbero compromettere il tessuto cardiaco, inducendo ischemia e rendendo instabile il preparato a causa di un'aumentata tendenza a sviluppare aritmie (Sutherland et al., 2000).

Quando tutti questi passaggi sono completati, il cuore viene chiuso in una camera mantenuta a 37°C dal bagno termostato.

1.6 Sistema di acquisizione e registrazione dei parametri

L'acquisizione dei dati relativi agli esperimenti avviene attraverso un sistema McLab collegato ad un computer che elabora i dati attraverso un *software Chart 6*, li registra sull' *hard disk* e li visualizza graficamente in tempo reale sul monitor.

L'interfaccia McLab utilizzata è un sistema collegato a due trasduttori di pressione e ad una sonda di temperatura: il primo trasduttore, collegato al palloncino, permette di registrare la pressione del ventricolo sinistro; il secondo trasduttore permette di misurare la pressione coronarica; il terzo canale è connesso ad una termocoppia che consente di monitorare la temperatura durante tutto il corso dell'esperimento.

I trasduttori di pressione vengono calibrati prima dell'inizio di ogni esperimento utilizzando un manometro a mercurio che permette di impostare sul computer un range fisiologico di valori di pressione in mmHg.

Il sistema di acquisizione simula un registratore su carta che, secondo la velocità di scorrimento impostata, permette di visualizzare singoli momenti dell'esperimento o il percorso sperimentale per intero.

1.7 Parametri dell'attività cardiaca

Il sistema di acquisizione ed elaborazione è impostato in modo tale da calcolare in tempo reale tutti i parametri emodinamici (fig. 11) che vengono salvati su un foglio di supporto Data Pad. Alla fine della registrazione i dati immagazzinati sul Data Pad possono essere trasferiti su un file Microsoft Excel per l'elaborazione statistica. I parametri emodinamici rilevati nel corso di un esperimento sul cuore isolato e perfuso secondo *Langendorff* possono essere distinti in tre classi dipendentemente dalla fase dell'attività cardiaca interessata.

1) parametri relativi all'attività sistolica:

- LVP (Left Ventricular Pressure, mmHg), rappresenta un indice della pressione sviluppata dal ventricolo sinistro in condizioni di lavoro isovolumetrico;
- $+LV(dP/dt)_{max}$ (mmHg x s^{-1}), indica la massima velocità di contrazione ventricolare;
- TTP (Time To Peak, ms), rappresenta il tempo necessario a raggiungere il picco di contrazione sistolica isovolumetrica;
- HR (Heart Rate, battiti x min^{-1}), rappresenta la frequenza cardiaca;
- RPP (Rate Pressure Product, mmHg x battiti x min^{-1}), pari al prodotto tra LVP ed HR, rappresenta un indice del lavoro cardiaco;

2) parametri relativi al recupero diastolico:

- LVEDP (Left Ventricular End Diastolic Pressure, mmHg x s^{-1}), è la pressione telediastolica sviluppata dal ventricolo sinistro;
- $-LV(dP/dt)_{max}$ (mmHg x s^{-1}), indica la massima velocità di rilassamento ventricolare;
- HTR (Half Time Relaxation, ms), indica la metà del tempo necessario al ventricolo sinistro per il completo recupero diastolico;
- T/t è dato dal rapporto tra $+LV(dP/dt)_{max}$ e $-LV(dP/dt)_{max}$;

3) parametri relativi alla funzionalità coronarica:

- CP (Coronary Pressure, mmHg), è la pressione dei vasi coronarici.

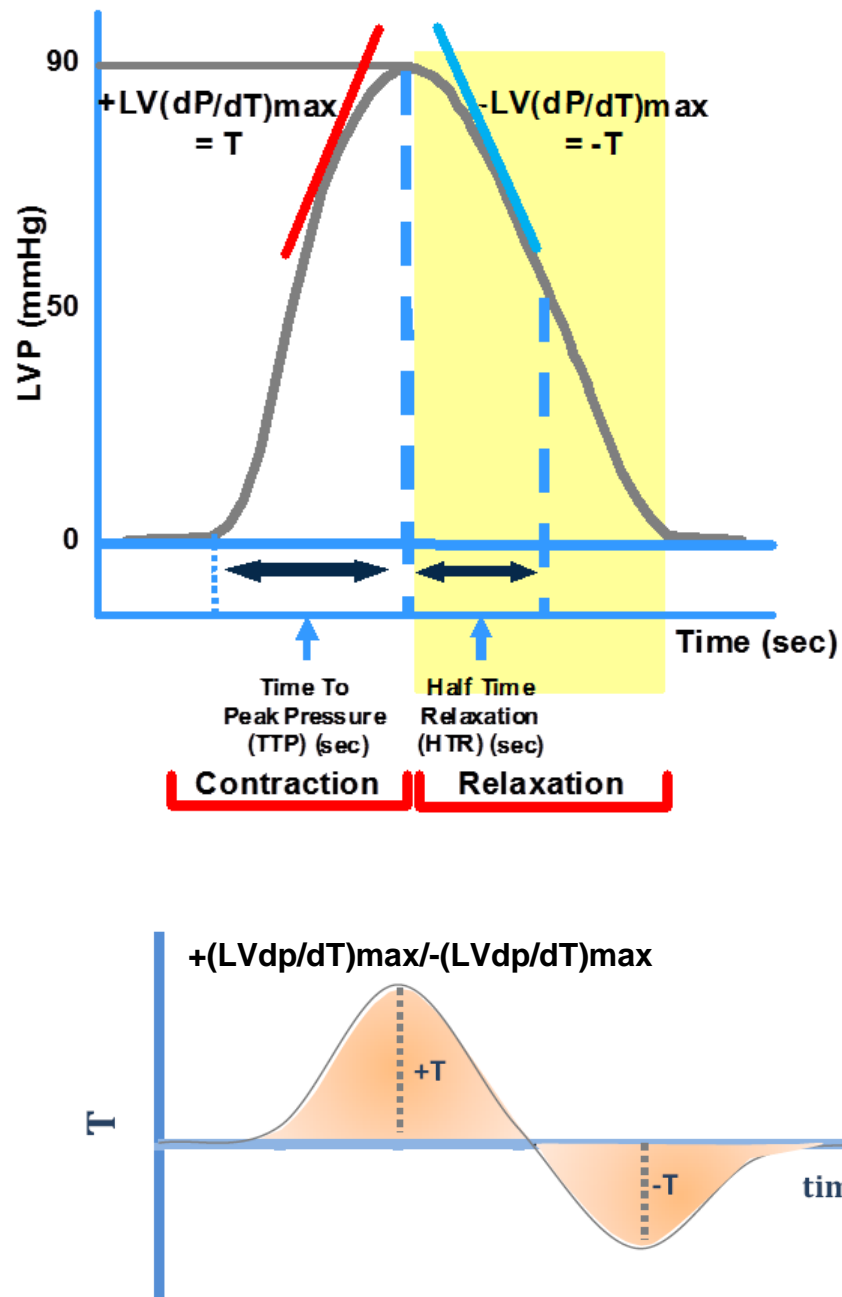


Fig. 11: Rappresentazione grafica dei parametri emodinamici valutabili mediante il sistema di acquisizione dati PowerLab nella metodica Langendorff.

1.8 Risposta cardiaca del meccanismo di Frank-Starling

Per accertare l'interazione tra nitriti e la risposta Frank-Starling, sono state generate curve di Starling aumentando il volume del palloncino intraventricolare in sei step di 10 μ L. La funzione cardiaca è stata valutata entro 1 minuto da ogni incremento di volume,

quando è stato raggiunto un nuovo stato costante. La valutazione totale della risposta di Frank-Starling è stata completata entro 15 minuti.

Dopo la valutazione di base, la pressione in entrata è stata riportata alle condizioni di controllo ed è stata generata una seconda curva di Frank-Starling in presenza di nitriti (10^{-8} M).

In una seconda serie di esperimenti, allo scopo di indagare il pathway trasduzionale nitriti-dipendente, è stata generata una prima curva Frank-Starling in presenza di nitriti. La pressione in entrata è stata riportata alla condizione di controllo ed è stata generata una seconda curva in presenza di nitriti più:

- il detergente Triton X-100 (0.01%);
- l'inibitore della NOS, L-NAME (10^{-5} M);
- lo scavenger dello NO, PTIO (10^{-7} M);
- lo scavenger dell'anione nitrossile (HNO), N-acetil-L-cisteina (10^{-5} M);
- l'inibitore specifico della sGC, 1H-(1,2,4) ossadiazolo-(4,3a) chinossalin-1-one (ODQ) (10^{-5} M);
- l'antagonista della proteina chinasi G (PKG), KT5823 (10^{-7} M);
- l'inibitore della pompa SERCA2a, la Tapsigargina (10^{-7} M).

Tutte le soluzioni sono state preparate in acqua bi-distillata. ODQ è stato preparato in etanolo. Le diluizioni sono state fatte in una soluzione di Krebs-Henseleit (KHs), immediatamente prima dell'uso. L-NAME, ODQ, P-TIO, N-acetil-L-cisteina (NAC), TRITON X-100 sono stati acquistati dalla Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA). KT5823 e Tapsigargina sono stati acquistati dalla Calbiochem (Milano).

Gli esperimenti condotti con sostanze fotosensibili come ODQ e KT5823 sono stati effettuati utilizzando un apparato modificato in modo da proteggere dalla luce ed evitare la degradazione di tali molecole.

2 Dosaggio elisa:determinazione di cGMP-cAMP intracellulare

Estratti di tessuto cardiaco congelato (tessuto endocardico e cardiomiociti presi da atri e ventricoli) usati per la determinazione di cGMP e cAMP (200-300 mg) sono stati trattati a 0°C con acido tricloroacetico al 6% e centrifugati a 10.000 giri per 10 min. Il sovratanante è stato estratto tre volte con 3 ml di dietilere saturato con acqua, e la fase acquosa è stata raccolta e conservata a -80°C. Le concentrazioni di cGMP e cAMP sono state misurate usando un metodo immunoanalitico che prevede l'uso di un kit commerciale (Biotrak enzyme immunoassay system; Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA).

3 Western blotting

Ad ogni campione è stata aggiunta una quantità di Buffer Laemmli in rapporto 1:1. I campioni sono stati successivamente sottoposti ad ebollizione per permettere la denaturazione delle proteine. Quantità uguali degli estratti proteici sono stati caricati su gel di poliacrilammide al 12%. Nel primo pozzetto del gel di poliacrilammide è stato caricato un marker a peso molecolare noto, che permette l'identificazione delle proteine in esame a seconda del loro peso molecolare. La corsa elettroforetica è stata condotta applicando una differenza di potenziale di 110 V per un tempo di circa 1 ora e 15 minuti a temperatura ambiente. Dopo la corsa, le proteine sono state trasferite su membrana mediante elettrotrasferimento in camera MINI-TRANSBLOT contenente un buffer di trasferimento a basso contenuto salino (TRIS 25 mM, Glicina 192 mM, pH 8.3 e SDS 10%, metanolo). La membrana è stata attivata immergendola in metanolo per circa 10 secondi. Il gel e la membrana sono stati disposti in modo da formare un "sandwich" all'interno di una camera formata da due elettrodi paralleli: in questo sistema il foglio di PVDF si verrà a trovare tra l'anodo e il gel (fig. 12).

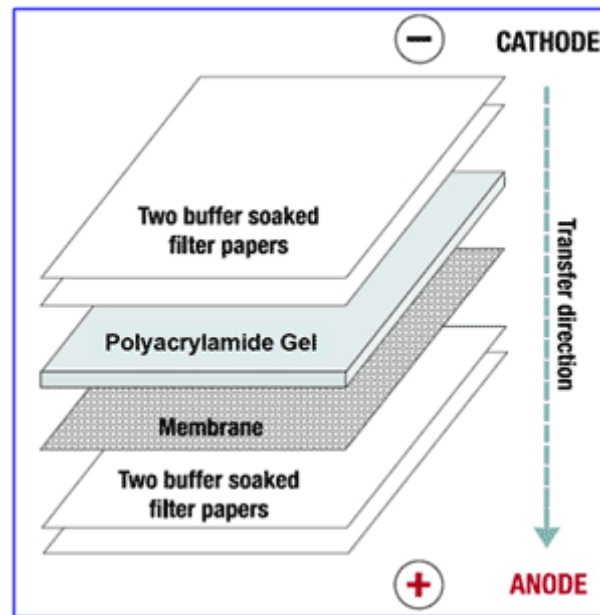


Fig. 12: Sandwich di spugne e carta Wattmann poste fra i due elettrodi.

Il trasferimento delle proteine è stato favorito dall'applicazione di una differenza di potenziale di circa 60V per 2 h a 4°C. L'effettivo trasferimento delle proteine sulla membrana è stato controllato immergendo per 2-3 min il foglio di PVDF in una soluzione di Red Poinceau. Successivamente la membrana è stata posta in una soluzione di milk non-fat in TBST 1X (TrisHCl 100 mM pH 7.5, NaCl 1 M, Tween 20 all'1%) per 1 h a temperatura ambiente in modo da bloccare tutti i siti aspecifici di interazione idrofobica. Dopo un breve lavaggio con buffer TBS 1X, il filtro di PVDF è stato incubato over-night con l'anticorpo primario specifico per la proteina da analizzare. Successivamente la soluzione con l'anticorpo primario è stata rimossa e la membrana sottoposta a tre lavaggi di 10 min ognuno con TBST 1X. In seguito la membrana è stata incubata per 1 h con anticorpo secondario (diluizione 1:2000 in TBST 1% e milk non-fat al 5%) in grado di riconoscere la porzione costante della IgG utilizzata come anticorpo primario coniugato con la perossidasi di rafano.

A questo punto la membrana è stata nuovamente lavata con TBST 1X e sottoposto a tecnica di immunorilevazione mediante l'utilizzo del Kit ECL System in

chemiluminescenza. L'enzima perossidasi, coniugato all'anticorpo secondario, è in grado di catalizzare in condizioni basiche l'ossidazione del luminolo, un substrato chemiluminescente. Il luminolo passando attraverso uno stato eccitato emette una certa quantità di luce che può essere visualizzata esponendo il filtro trattato ad una lastra fotografica (Hyperfilm ECL) (fig. 13).

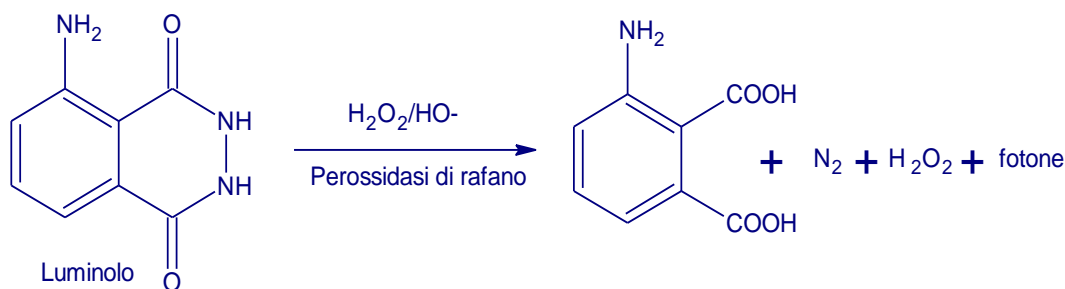


Fig. 13: Reazione di chemiluminescenza che consente la visualizzazione sulla lastra fotografica.

3.1 Sostanze chimiche

Materiali e sostanze utilizzati per il Western Blotting:

Sodio-dodecil-solfato (SDS) (Sigma-Aldrich, Italia); Metanolo (Sigma-Aldrich Italia); Polioxi-Etilen-Sorbitan-Monolaureato, Tween 20 (Sigma-Aldrich Italia); ECL-Kit (GE Healthcare, Milano, Italia); Hyperfilm ECL (Roche Diagnostics, Italia); Carta Watman 3mm (Sigma-Aldrich, Italia); Bench MarchTM Pre-Stained Protein Ladder (Invitrogen, Italia); Bradford Protein Assay Kit (Calbiochem, Italia); Mini Trans Blot (Biorad, Italia); Hybond-P Nitrocellulose (GE Healthcare, Milano, Italia); streptavidina-HRP (Sigma, Italia); HEPES, NaCl, MgCl₂, EGTA, Glicerolo, Sodio-dodecil-solfato (SDS), Metanolo, Aprotinina, Na-orto-vanadato, PMS-F (Fenilmetilsulfonilfluoride), Polioxi-Etilen-Sorbitan-Monolaurato, Tween 20 (Sigma Aldrich, Milano, Italia), ECL-Kit (GE Healthcare), Hyperfilm ECL (Amersham), Carta Whatmann 3 mm, Bradford Protein Assay Kit (Sigma-Aldrich), Mini Trans Blot (Biorad, Italy), Hybond-P Nitrocellulose (GE Healthcare), Albumina Sierica Bovina frazione V (BSA) (Sigma-Aldrich).

Sono stati utilizzati anticorpi primari diretti contro: peNOS (rabbit polyclonal IgG), e Kir 2.1.(Santa Cruz, DBA Italia). Gli anticorpi primari sono stati riconosciuti mediante appositi anticorpi secondari anti-mouse, anti-rabbit coniugati con perossidasi di rafano (Santa Cruz, DBA Italia).

4 Biotin switch-assay

Al fine di rilevare le proteine S-nitrosilate è stato utilizzato il metodo Biotin Switch, così come riportato da Jaffrey e Snyder nel 2001.

Tale saggio prevede come primo step il blocco dei gruppi SH, come secondo step la riduzione dei gruppi SNO a gruppi SH e come terzo step il legame della biotina a tali gruppi SH. Le proteine “biotinilate” vengono successivamente sottoposte ad un comune Western Blotting. In seguito alla corsa elettroforetica e al trasferimento, le membrane vengono incubate con la streptavidina e dalla rilevazione del complesso biotina-streptavidina si ha dunque la possibilità di analizzare i livelli di nitrosilazione delle proteine di cuori controllo e cuori trattati.

I cuori di ratto perfusi sono stati istantaneamente congelati in azoto liquido e al momento opportuno omogenati e sottoposti al cosiddetto Biotin Switch Assay (Jaffrey et al., 2001; Jaffrey e Snyder, 2001). Il campione di partenza, opportunamente aggiustato alla concentrazione di 1 mg/ml di proteine viene prima trattato con un *blocking buffer* (225 mM Hepes, pH 7.7, 0.9 mM EDTA, 0.09 mM neocuproine, 2.5% SDS, 20 mM MMTS) a 50°C per 20 minuti, affinché i gruppi SH liberi possano essere bloccati; poi viene precipitato con acetone freddo, centrifugato a 4°C per 5 minuti a 2000 g e risospeso in *lens buffer* (250 mM Hepes, pH 7.7, 1 mM EDTA, 0.1 mM neocuproine, 1% SDS). Tutte queste operazioni vengono condotte al buio. Successivamente i campioni vengono incubati per 1 ora a temperatura ambiente con una

soluzione contenente acido ascorbico e biotina: l'acido ascorbico riduce i gruppi SNO in gruppi SH liberi cui la biotina va a legarsi. Le proteine così biotinite sono nuovamente precipitate con acetone freddo, centrifugate a 4°C per 5 minuti a 2000 g e risospese in *hens buffer*.

Tali proteine biotinite sono sottoposte a Western Blotting: le proteine vengono caricate su gel al 12% e, in seguito alla corsa elettroforetica, vengono trasferite su membrana che viene incubata per 1 ora prima con il latte al 5% e poi con la streptavidina diluita 1:5000. Si procede infine con lo sviluppo con ECL su lastra (fig. 14).

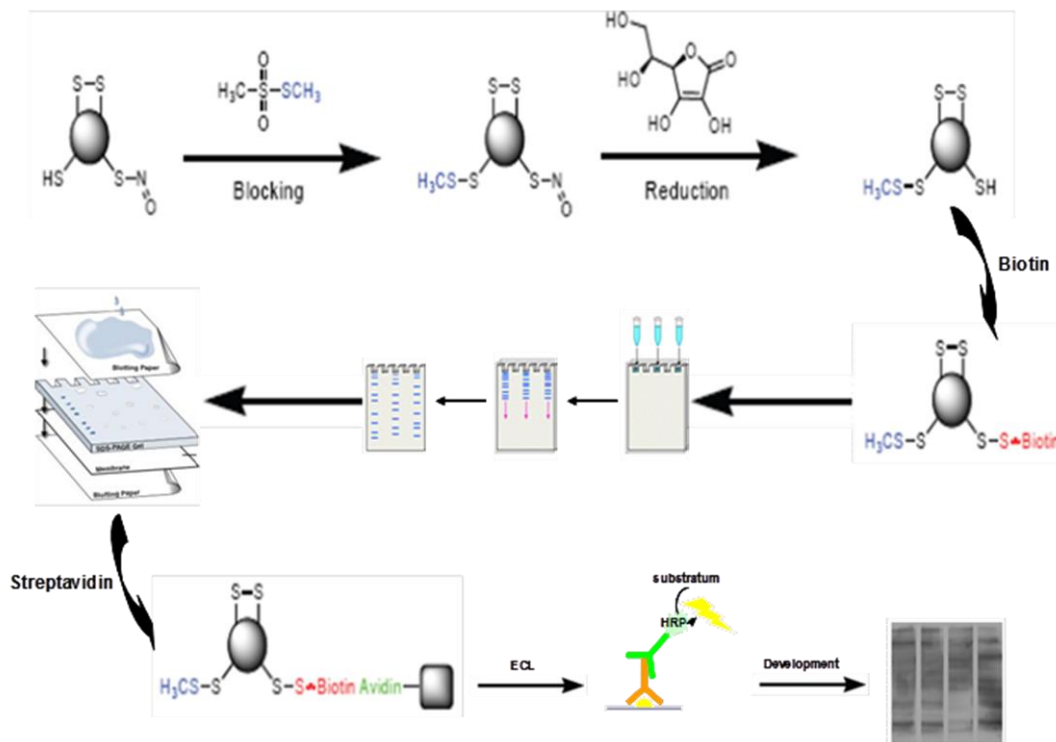


Fig. 14: Biotin Switch Assay.

5 Separazione su gradiente di saccarosio

La formazione del gradiente è stata condotta attraverso l'utilizzo di un gradientatore (fig. 15) munito di due camere, una detta di mescolamento ed un serbatoio, che sono state riempite con soluzioni di saccarosio a densità differente. Le due camere

comunicano tra di loro attraverso una valvola. La camera di mescolamento è dotata di un rubinetto e di un tubo per l'uscita del liquido ed in genere è presente al suo interno un agitatore magnetico.

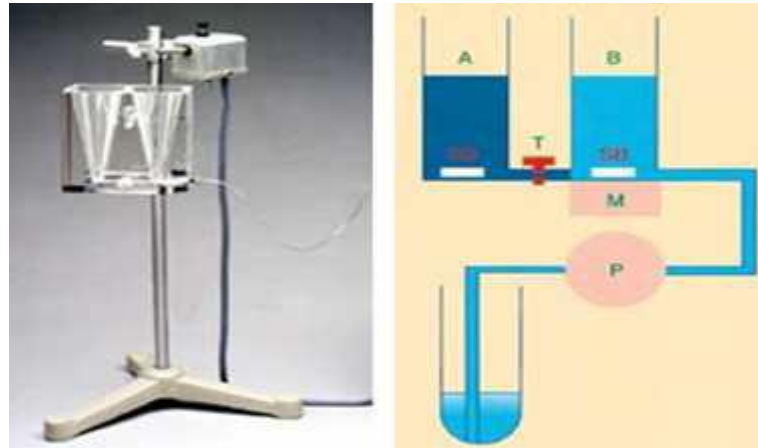


Fig. 15: *Gradientatore.*

Nella tecnica usata, detta di caricamento dal basso, la camera di mescolamento contiene la soluzione a bassa densità mentre il serbatoio quella ad alta densità. Le due camere vengono riempite con uguali quantità delle due soluzioni, si apre la valvola di collegamento ed il rubinetto di uscita. Dal tubo così fluirà prima la soluzione meno densa, mentre pian piano la soluzione ad alta densità passerà nella camera di mescolamento. Quindi dal tubo uscirà una soluzione gradualmente sempre più densa che sposterà verso l'alto la soluzione meno densa. Le soluzioni usate per la formazione del gradiente sono state preparate a due concentrazioni diverse: soluzione al 65% di saccarosio in KCl 0,6 M, soluzione al 25% di saccarosio in KCl 0,6 M. Una volta preparati, i due gradienti sono stati fatti riposare overnight in camera fredda ad una temperatura di 5° C.

I cuori sono stati omogeneizzati mediante un polytron, in ghiaccio in Soluzione A (mannitolo 250 mM, EDTA 1 mM, protease inhibitor cocktail, pH 7.8). L'omogenato è stato centrifugato a 25000 rpm per 1 ora a 4°C. Successivamente il pellet è stato

risospeso nello stesso volume di Soluzione A e 1 ml di campione è stato depositato su un gradiente continuo di saccarosio. Negli esperimenti da noi condotti, al campione sono state aggiunte anche alcune gocce di Coomassie Brilliant Blue per facilitare la visualizzazione delle bande che si formano durante la centrifugazione. Il gradiente di saccarosio con il campione è stato così sottoposto a centrifugazione a 110000 g per 2 h a 4 °C. Alla fine della centrifugazione sono state prelevate, tramite capillare di vetro collegato ad una pompa peristaltica, le bande contenenti:

- membrane plasmatiche (I banda)
- reticolo sarcoplasmatico (II banda)
- mitocondri (III banda)
- nuclei (IV banda)

La concentrazione proteica all'interno delle bande è stata determinata utilizzando il metodo Bradford. Il campione è stato aggiustato ad una concentrazione proteica di 0,5 mg/ml diluendo con acqua distillata. A questo punto tutte le varie frazioni sono state sottoposte singolarmente al Biotin switch assay . Per confrontare le bande di nitrosilazione riscontrate nella frazione delle membrane plasmatiche con il canale del potassio Kir 2.1 è stato utilizzato un anticorpo Kir 2.1 rabbit polyclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology). Partendo dalla stessa frazione di membrana isolata su gradiente di saccarosio una parte del campione è stata sottoposta al Biotin switch assay mentre una parte è stata sottoposta ad un comune western blotting e successivamente incubata con l'anticorpo anti Kir 2.1.

6 Dosaggio intermedi reazione nitriti-Hb

Per questi dosaggi è stata utilizzata Hb purificata di hagfish. Gli esperimenti sono stati condotti a 25°C utilizzando un particolare tonimetro con una cuvetta di vetro da 3ml con percorso luce da 1 cm che riceve un flusso costante di gas umidificati attraverso un

miscelatore. La tensione di O₂ richiesta è stata ottenuta miscelando aria e N₂ (O₂ ± 5 p.p.m. = 0,0037 mmHg) nel rapporto appropriato. Nella cuvetta sono stati inseriti 3 ml di Hb ed equilibrati per 1 h in agitazione affinché fosse garantito l'equilibrio tra l'Hb e i gas del sistema. La cuvetta è stata quindi trasferita in un spettrofotometro Cecil CE2041 (Cambridge, UK) per registrare l'assorbanza dell'Hb nel range 480-700 nm. Successivamente, sono stati aggiunti 9,1 µL di una soluzione di NaNO₂ 140 (mM) per ottenere un rapporto [NO₂]/[Hb] di 2,7. Le successive scansioni spettrali sono state eseguite ad intervalli costanti durante tutta la reazione. Il flusso di gas è stato mantenuto costante durante l'intero esperimento, affinché fosse garantita la P_{O₂}.

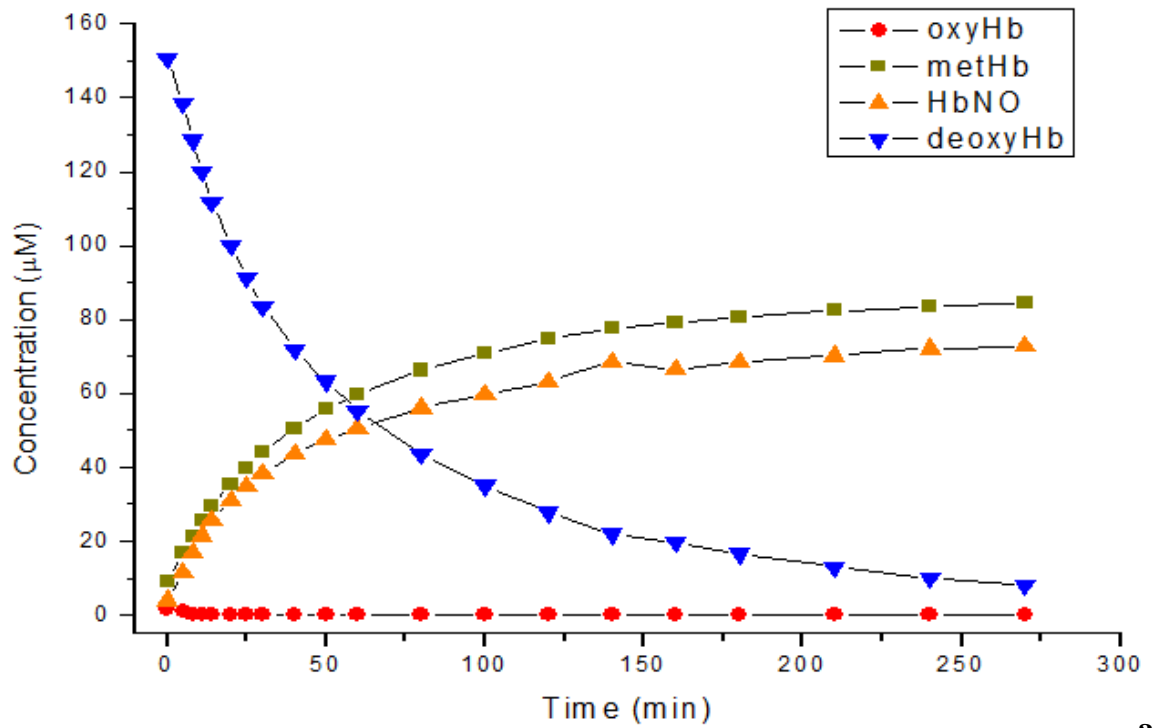
7 Analisi statistica

I parametri emodinamici relativi agli esperimenti di perfusione cardiaca (ed i valori ad essi riferiti) sono espressi come medie \pm errore standard (SEM) delle variazioni percentuali rispetto ai valori di controllo. Il confronto tra i gruppi, utile per individuare eventuali differenze significative tra le diverse condizioni sperimentali, è stato valutato mediante *two-way ANOVA*, seguito dal *Bonferroni post-hoc test*; le variazioni sono considerate significative per $p < 0,05$ (§). Le analisi densitometriche dei blots ottenuti con Western blotting sono espresse in Densitometric units e le differenze tra i risultati ottenuti ed i valori di controllo sono state valutate mediante *two-way ANOVA*, seguito dal *Bonferroni post-hoc test*; le variazioni sono considerate significative per $p < 0,05$ (§). Per quanto riguarda i dosaggi degli intermedi della reazione tra Hb e nitriti i risultati sono stati espressi come valore assoluto delle determinazioni di ogni campione. Le concentrazioni dei quattro derivati dell'Hb (deossi-Hb, ossi-Hb, metHb e HbNO) sono state valutate tramite deconvoluzione spettrale individuale in funzione del tempo. I valori relativi alla reazione dei nitriti con deossi-Hb e ossi-Hb sono stati ottenuti dalla differenziazione della loro concentrazione rispetto al tempo, utilizzando un software specifico (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

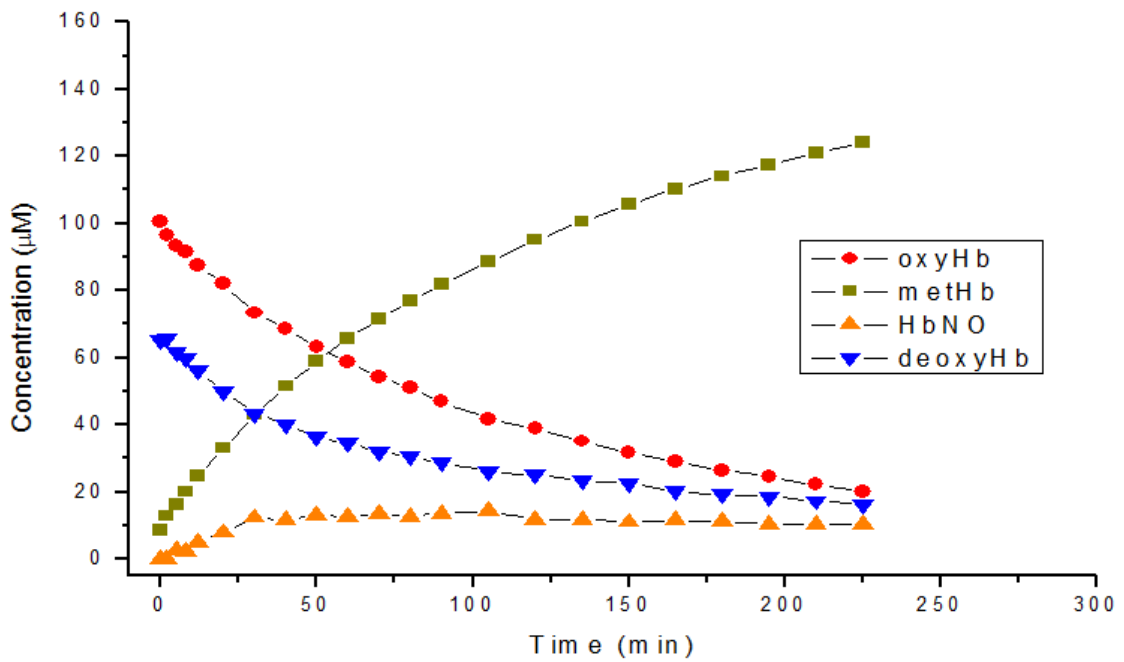
RISULTATI

1. Interazione dei nitriti con l'emoglobina a basse e alte saturazioni di ossigeno.

Al fine di analizzare la velocità di reazione nitriti-Hb, sono stati effettuati una serie di esperimenti utilizzando Hb purificata di hagfish. Utilizzando uno spettrofotometro abbiamo acquisito le variazioni dei valori di assorbanza dell'emoglobina durante il tempo di reazione con i nitriti. I risultati ottenuti mostrano che, in condizioni anossiche, quando i nitriti reagiscono quindi con la deossiemoglobina, la concentrazione di quest'ultima diminuisce e la reazione porta alla formazione di HbNO e metaemoglobina in un rapporto stechiometrico 1:1. Quando la concentrazione della deossi-Hb diminuisce, raggiungendo valori vicino lo zero, la concentrazione di HbNO decresce lentamente mentre la concentrazione di met-Hb continua ad aumentare indicando che una piccola quantità dello NO si dissocia contribuendo all'ossidazione dell'Hb la quale sarà nello stato di ossidazione "ferrico" (fig. 16/a). Quando, invece, la reazione tra nitriti ed Hb avviene in condizioni parzialmente ossigenate ($S_{O_2} \pm 60\%$), la concentrazione della deossi-Hb diminuisce più velocemente rispetto alla concentrazione della ossi-Hb dimostrando che la reazione tra nitriti e deossiemoglobina è favorita rispetto a quella con l'emoglobina ossigenata (fig. 16/b). Questi risultati mostrano che l'emoglobina di animali che facilmente sono in grado di tollerare condizioni ipossiche, sono in grado di produrre una maggiore quantità dello NO a partire dai nitriti suggerendo che questo meccanismo adattativo può assumere un'importanza rilevante in specie ectoterme che periodicamente sono esposte a condizioni ambientali ipossiche.



a



b

Fig. 16: Variazioni tempo-dipendenti della concentrazione di ossi-Hb, deossi-Hb, met-Hb e HbNO durante la reazione dei nitriti e L'Hb di hagfish in condizioni di anossia (a) e in condizioni di ossigenazione parziale (b). $[Hb]=155 \mu M$, rapporto delle concentrazioni di nitriti ed Hb durante ogni esperimento è 2.7. Gli esperimenti sono stati condotti ad una temperatura di 25 C° .

2. Influenza dei nitriti sulla risposta cardiaca al meccanismo di Frank-Starling

Per determinare gli effetti che i nitriti esercitano sulla risposta cardiaca del meccanismo di Frank-Starling, la performance cardiaca è stata valutata prima e dopo trattamento con una singola concentrazione di nitriti (10^{-8} M). La concentrazione di nitriti è stata scelta come una delle più basse in grado di modulare significativamente la prestazione cardiaca basale come riportato da Pellegrino e collaboratori (2009). I risultati ottenuti mostrano un significativo aumento della risposta di Frank-Starling in presenza di nitriti rispetto a quanto ottenuto in cuori controllo, rilevabile da un'aumento significativo di LVP (fig. 17/a) e $+(LVdP/dT)_{max}$ (fig. 17/b). Inoltre, accanto all'effetto sull'inotropismo, in presenza di nitriti la risposta di Frank-Starling risulta notevolmente potenziata anche dal punto di vista lusitropico, come dimostrato dall'aumento significativo del parametro $-(LVdP/dT)_{max}$ indice di un cambiamento di rilassamento miocardico (fig. 17/c). Esperimenti preliminari (dati non mostrati) hanno mostrato che, in condizioni basali, l'effetto massimo dei nitriti è ottenuto a 5 min dopo l'esposizione iniziale e rimane stabile fino a 15-20 min. La valutazione di ogni curva di Frank-Starling è stata completata entro questo tempo.

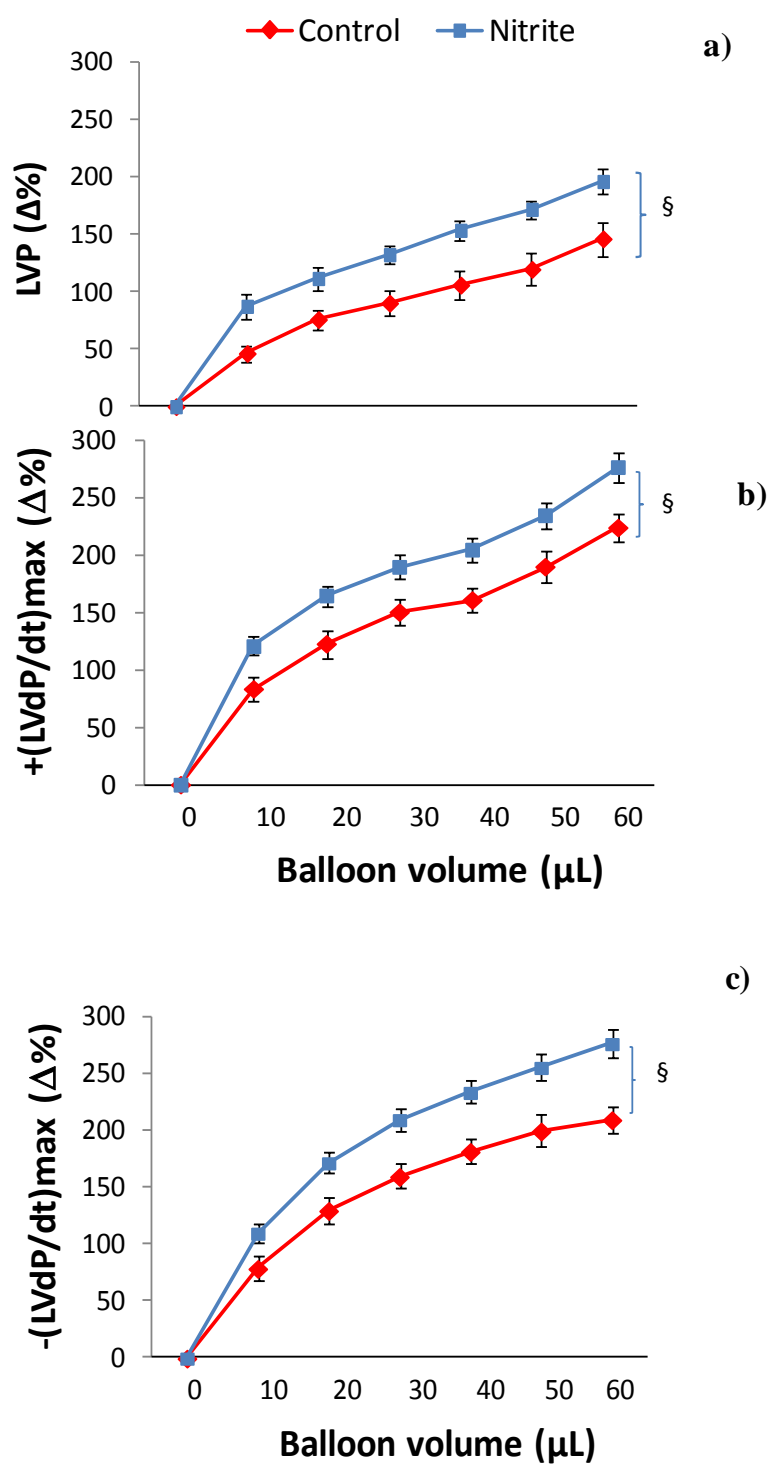


Fig. 17: Effetti dell'incremento di 10 μL del volume del palloncino in lattice collocato nel ventricolo sinistro relativi ai parametri LVP(a), $+(LVdp/dt)_{\text{max}}$ (b) e $-(LVdp/dt)_{\text{max}}$ (c) prima e dopo trattamento con singola concentrazione di nitriti (10^{-8} M). I risultati sono espressi come medie delle variazioni percentuali \pm errore standard di 5-6 esperimenti per ogni gruppo. Le variazioni significative, rispetto al controllo, sono state elaborate mediante two-way ANOVA: $\S=p<0.05$.

3. Ruolo dello NO e dello HNO nella risposta di Frank-starling

Per chiarire se l'effetto nitriti-dipendente sulla risposta di Frank-Starling è mediato dallo NO NOS-prodotto, i preparati cardiaci sono stati esposti a singola concentrazione di nitriti in presenza di un inibitore delle NOSs, L-NAME (10^{-5} M). I risultati ottenuti hanno evidenziato che questo trattamento non è in grado di modificare l'effetto positivo nitriti-dipendente sulla risposta di Frank-Starling (fig. 18/a). L'analisi dell'espressione dell'enzima p-eNOS in omogenati cardiaci non ha mostrato variazioni in seguito al trattamento con nitriti confermando che questo enzima non è coinvolto (fig. 18/b). Il coinvolgimento dello NO prodotto a livello endoteliale è stato analizzato esponendo i preparati cardiaci a pre-trattamento con TRITON-X100, sostanza in grado di danneggiare funzionalmente ma non strutturalmente l'endotelio. Questo pre-trattamento non modifica la risposta cardiaca al meccanismo di Frank-Starling nitriti-dipendente (fig. 18/c). La partecipazione dello NO endogeno è stata valutata anche in presenza di PTIO (10^{-7} M), scavenger dello NO somministrato insieme alla singola concentrazione di nitriti, che ha abolito l'effetto mediato dai nitriti (fig. 19/a). Poiché i nitriti possono anche essere ridotti a nitrossile (HNO), un potente agente ossidante e S-nitrosilante (Paolucci et al., 2007) in grado di indurre un effetto inotropo positivo (Paolucci et al., 2003), sono state effettuate curve di Frank-Starling in presenza di uno scavenger di HNO, la NAC. I risultati ottenuti indicano che gli effetti dei nitriti sono indipendenti dalla generazione di HNO (fig. 19/b).

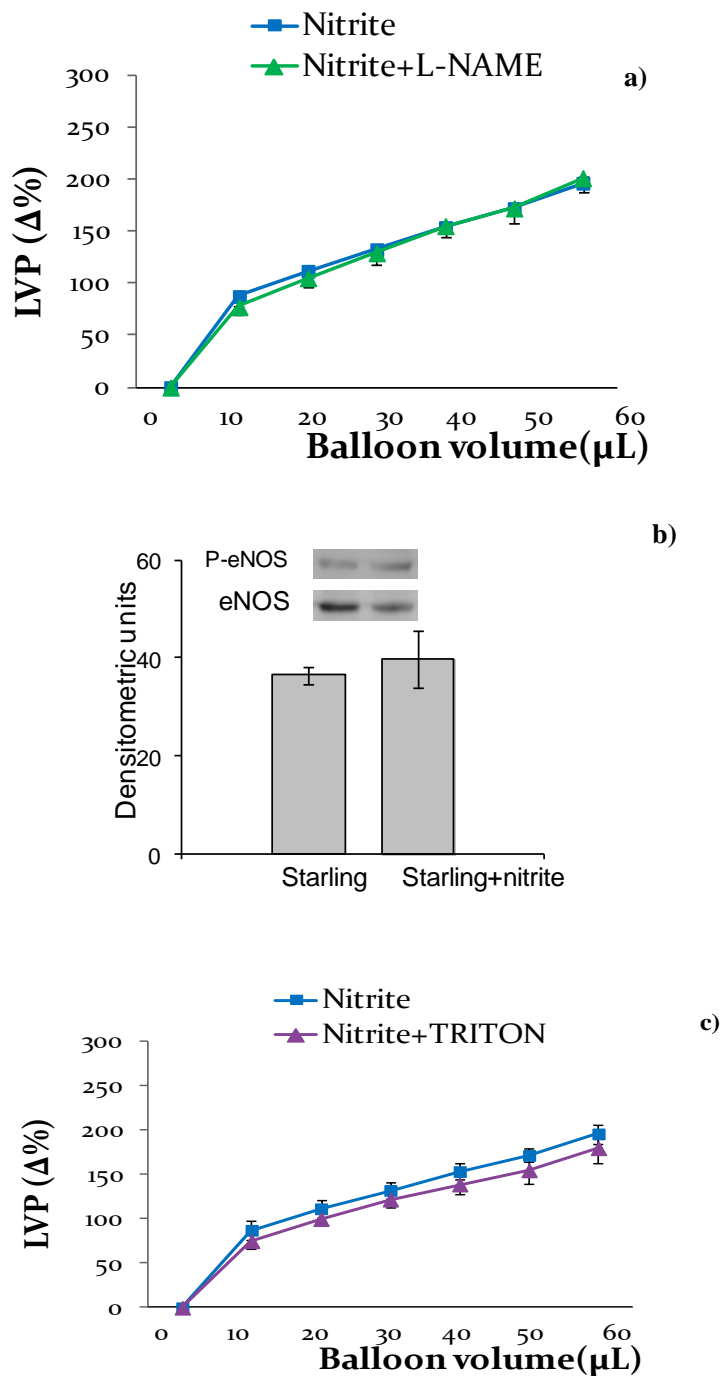


Fig. 18: Effetti dell'incremento di 10 μL del volume del palloncino in lattice collocato nel ventricolo sinistro relativi al parametro LVP, dopo trattamento con nitriti (10^{-8}M) o con nitriti + L-NAME (10^{-5}M) a) e dopo trattamento con nitriti o con nitriti + TRITONX100 (c) I valori sono espressi come medie \pm errore standard (SEM) di 4 o 5 esperimenti per ogni gruppo. Il confronto tra i gruppi è stato fatto usando l'analisi two-way ANOVA ($\$ = p < 0.05$). (b) Western Blot della NOS endoteliale fosforilata (P-eNOS) nei cuori omogenati. I valori densitometrici sono espressi come medie \pm errore standard (SEM) di 5 esperimenti per ogni gruppo, mediante analisi one-way ANOVA.

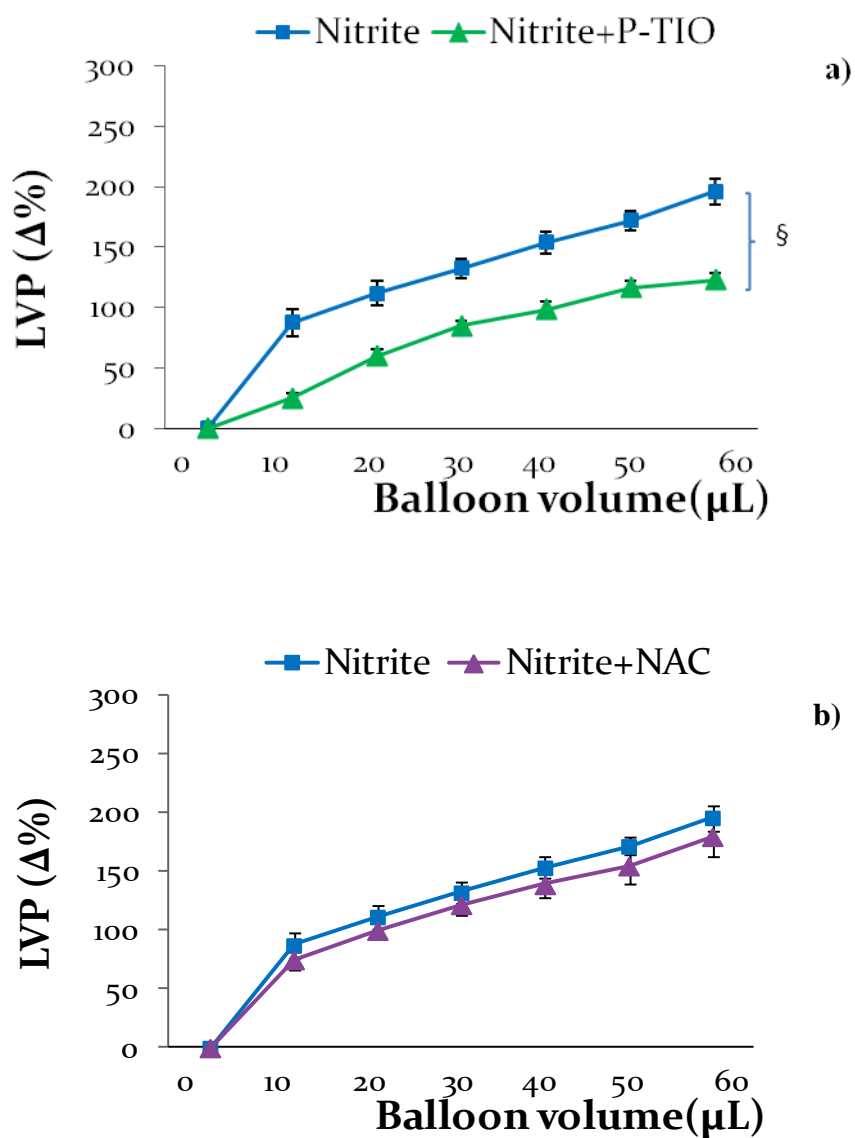


Fig. 19: Effetti dell'incremento di 10 μL del volume del palloncino in lattice collocato nel ventricolo sinistro relativi al parametro LVP, dopo trattamento con singola concentrazione di nitriti (10^{-8} M) o nitriti+PTIO (10^{-7} M) (a) e nitriti o nitriti+Nac (10^{-5} M) (b). I risultati sono espressi come medie delle variazioni percentuali \pm errore standard di 4-5 esperimenti per ogni gruppo. Le variazioni significative, rispetto al controllo, sono state elaborate mediante two-way ANOVA: $\S=p<0.05$.

4. Coinvolgimento della cascata trasduzionale cGMP-PKG nella risposta di Frank-Starling

Diversi studi hanno dimostrato che lo NO modula la performance cardiaca mediante attivazione della guanilato-ciclastasi solubile (sGC) (Amrani et al., 1992; Mayer et al., 1998). Per determinare se questo meccanismo sia coinvolto nella modulazione nitrito-dipendente della risposta di Frank-Starling, i preparati cardiaci sono stati trattati con singola concentrazione di nitriti (10^{-8} M) in presenza di ODQ (10^{-5} M), un potente ossidante e inibitore della sGC. Poiché ODQ ha bloccato l'effetto nitrito-dipendente sulla risposta eterometrica (fig. 20/a), per testare ulteriormente il coinvolgimento del cGMP, abbiamo inibito PKG, perfondendo i cuori con KT5823 (10^{-7} M). Al pari di quanto osservato in presenza di ODQ, anche questo trattamento ha abolito l'effetto indotto dai nitriti (fig. 20/b), sostenendo in tal modo il coinvolgimento del pathway NO-sGC-PKG nella modulazione eterometrica nitrito-dipendente. In accordo con questi risultati, è stato dimostrato che i livelli di cGMP intracardico risultavano più alti nei cuori sottoposti a curve di Frank-Starling in presenza di nitriti rispetto ai cuori di controllo. Abbiamo inoltre verificato i livelli di cAMP nei due casi senza riscontrare differenze significative (dati non mostrati).

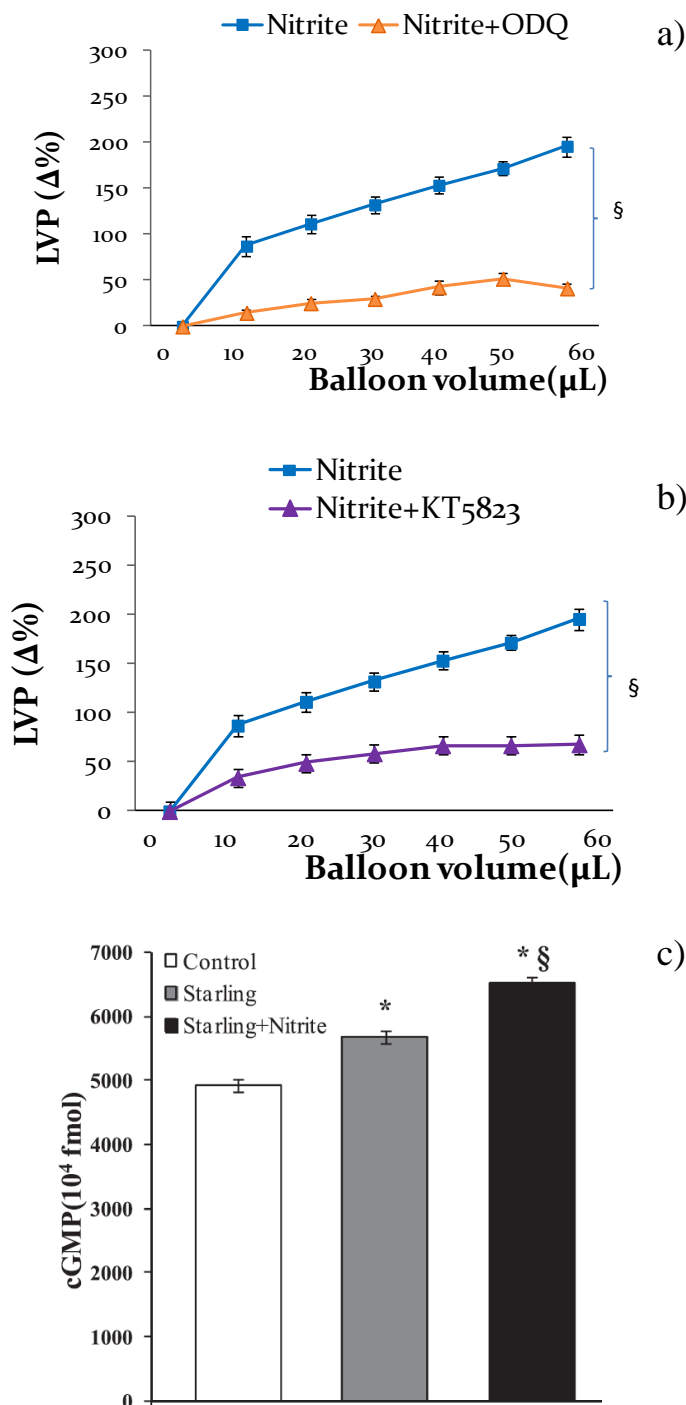


Fig. 20: Effetti dell'incremento di 10 μL del volume del palloncino in lattice collocato nel ventricolo sinistro relativi al parametro LVP, dopo trattamento con singola concentrazione di nitriti (10^{-8} M) o nitriti+ODQ (10^{-5} M) (a) e nitriti o nitriti+KT5823 (10^{-7} M) (b). I risultati sono espressi come medie delle variazioni percentuali \pm errore standard di 4-5 esperimenti per ogni gruppo. Le variazioni significative, rispetto al controllo, sono state elaborate mediante two-way ANOVA: $\S=p<0.05$ (c) livelli di cGMP in cuori controllo, sottoposti a curve di Frank-Starling e Frank-Starling+Nitriti (10^{-8} M). Le variazioni significative, rispetto al controllo, sono state elaborate mediante one-way ANOVA: * $P < 0.05$. Confronto tra I gruppi:(one-way ANOVA): $\S=p<0.05$; $n = 4$ per ogni gruppo.

5. Coinvolgimento delle pompe SERCA2a nella risposta di Frank-Starling

Lo NO è implicato nella modulazione del ciclo del Ca^{2+} durante lo stretch dei cardiomiociti, influenzando canali per il Ca^{2+} e pompe SERCA2a (Massion et al., 2005; Petroff et al., 2001; Sun et al., 2006). Pertanto, per valutare il possibile coinvolgimento di Ca^{2+} intracellulare in risposta all'aumento del precarico, abbiamo trattato i preparati cardiaci con nitriti più taspigargina (10^{-7} M), un inibitore delle pompe SERCA2a. I risultati ottenuti mostrano che la taspigargina ha ridotto significativamente l'effetto positivo sulla risposta di Frank-Starling nitriti-dipendente (fig. 21), suggerendo il coinvolgimento dello NO derivato dai nitriti nel reuptake del Ca^{2+} a livello del reticolo sarcoplasmatico.

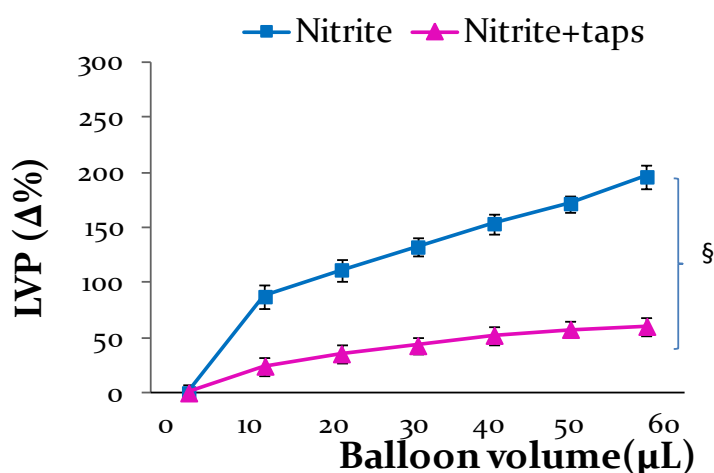


Fig. 21: Effetti dell'incremento di 10 μL del volume del palloncino in lattice collocato nel ventricolo sinistro relativi al parametro LVP, dopo trattamento con singola concentrazione di nitriti (10^{-8} M) o nitriti+Taspigargina (10^{-7} M). I risultati sono espressi come medie delle variazioni percentuali \pm errore standard di 4-5 esperimenti per ogni gruppo. Le variazioni significative, rispetto al controllo, sono state elaborate mediante two-way ANOVA: §= $p < 0.05$.

6. S-nitrosilazione delle proteine cardiache

La S-nitrosilazione è recentemente emersa come importante processo in grado di modulare l'attività di importanti proteine anche a livello cardiaco e, quindi, è ritenuta una reazione fondamentale attraverso cui lo NO è in grado di modulare direttamente anche la performance cardiaca stessa. Diverse evidenze sperimentali (Cosby et al., 2003; Bryan et al., 2005; Pellegrino et al., 2009) hanno dimostrato che i nitriti mediano i loro effetti attraverso la loro conversione nello NO, e dunque, il grado di S-nitrosilazione indotto da nitriti è stato confrontato con quello indotto dal donatore dello NO, GSNO. L'approccio sperimentale si è avvalso dell'utilizzo del biotin switch assay, utilizzato con successo in vari tessuti e tipi di cellule di mammifero, che ha permesso di valutare se l'esposizione a singole concentrazioni di nitriti del cuore di ratto perfuso secondo *Langendorff* sia in grado di indurre S-nitrosilazione. A tal scopo, sono state analizzate le proteine contenenti cisteine S-nitrosilate in estratti citosolici e di membrana dei cuori di controllo, dei cuori perfusi con una singola concentrazione di nitriti e dei cuori perfusi con singola concentrazione di GSNO. I risultati ottenuti dimostrano che nei cuori trattati con nitriti e GSNO aumentano i livelli di S-nitrosilazione delle proteine di membrana mentre in quelle contenute nella frazione citosolica non si rilevano variazioni rispetto al controllo (fig. 22). L'analisi densitometrica dei blots corrispondenti alla frazione di membrana in cui maggiormente sono presenti variazioni rispetto al controllo ha evidenziato un aumento significativo dei livelli di S-nitrosilazione delle proteine con peso molecolare compreso tra: 10-20 kDa, 40-60 kDa e 60-90 kDa (fig. 22).

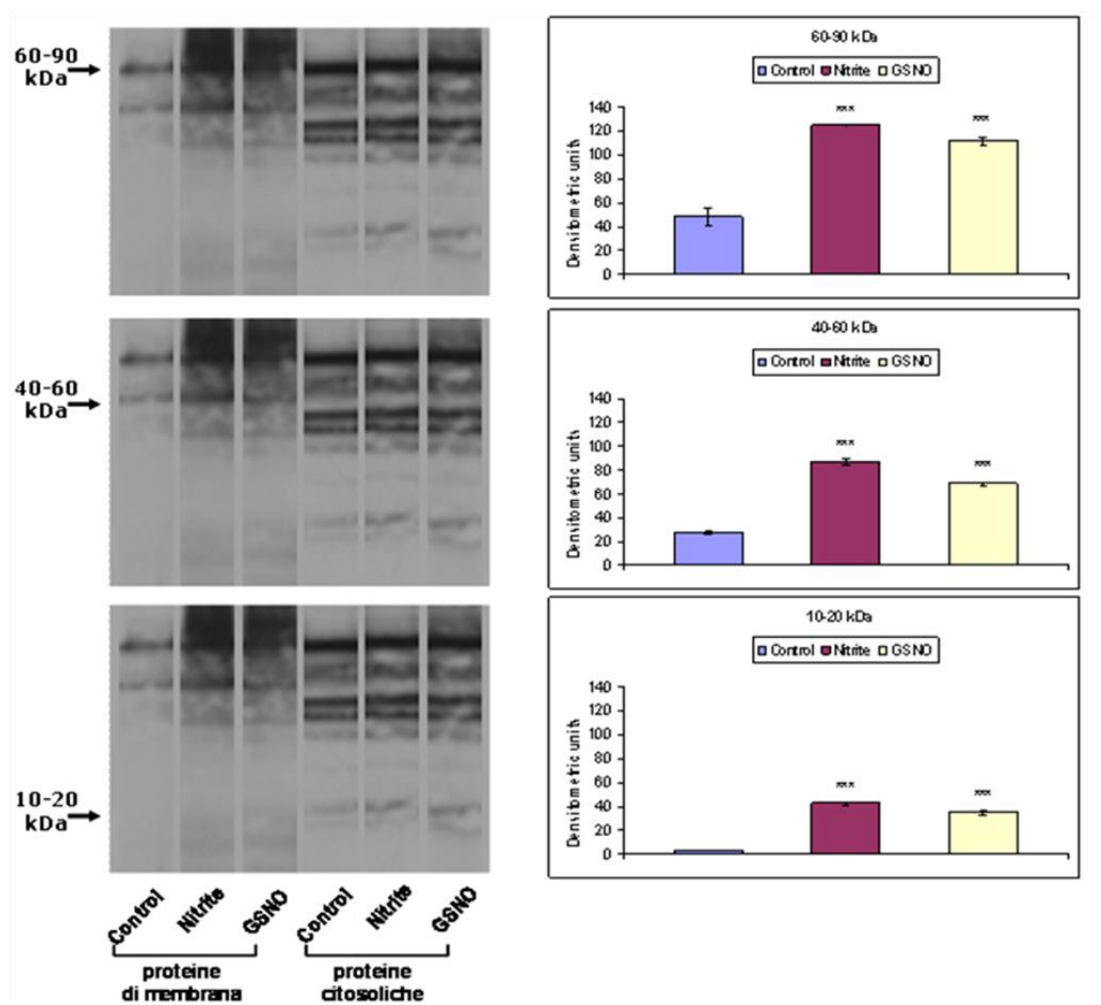


Fig. 22: Western blot ed analisi densitometrica delle proteine S-nitrosilate su omogenato di cuore di ratto.

Per discriminare ulteriormente le proteine coinvolte nel processo di S-nitrosilazione, abbiamo proceduto separando le singole frazioni di membrana di cuori di controllo e cuori trattati con nitriti e GSNO utilizzando un gradiente continuo di saccarosio. Questa metodica consente di ottenere quattro frazioni contenenti rispettivamente:

- membrane plasmatiche (I banda)
- reticolo sarcoplasmatico (II banda)
- membrane mitocondriali (III banda)
- membrane nucleari (IV banda)

Ogni singola banda è stata sottoposta al Biotin Switch Assay e quindi ad un comune Western Blotting. I risultati ottenuti dimostrano che nella frazione contenente le membrane plasmatiche ed in quella contenente le membrane del reticolo sarcoplasmatico, dopo il trattamento sia con nitriti che con GSNO, si ha un più marcato aumento dei livelli di S-nitrosilazione osservabile nel range di peso molecolare corrispondente a 45- 50 kDa e 60-90 kDa(fig. 23).

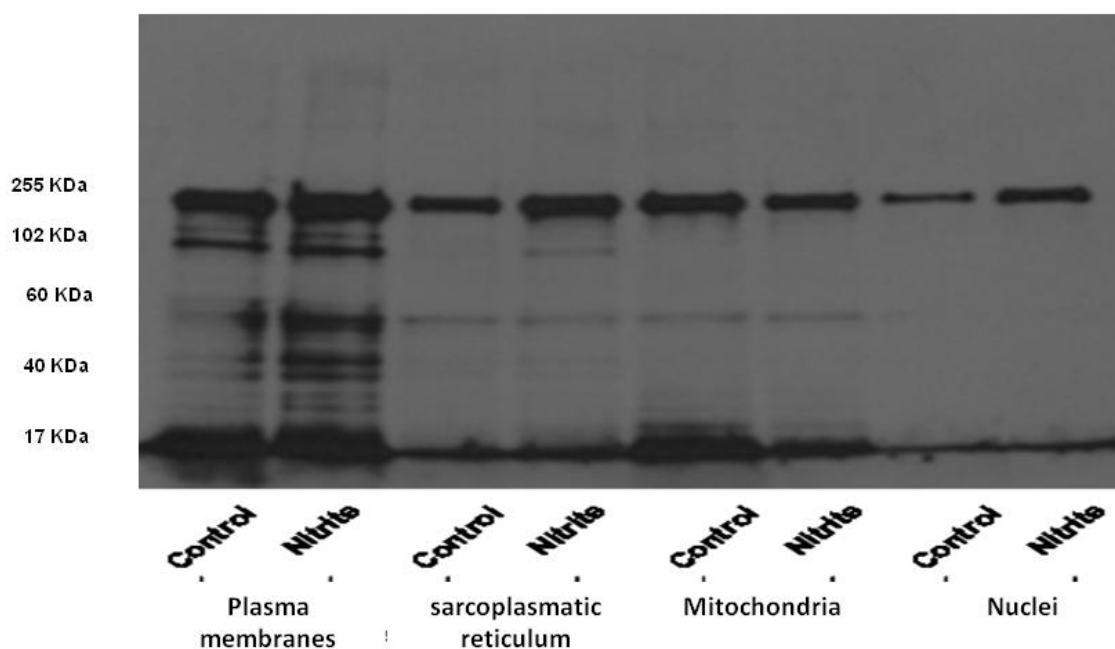


Fig. 23: Western blotting delle proteine S-nitrosilate sulle varie frazioni di membrana isolate su gradiente di saccarosio.

Per individuare le proteine specifiche con peso molecolare compreso in questo intervallo abbiamo consultato un database (www.expasy.org) in cui vengono raccolte tutte le informazioni riguardo proteine o sequenze nucleotidiche di varie specie e dove è anche possibile indagare sui siti coinvolti in modificazioni post-trasduzionali, tra cui la nitrosilazione. Abbiamo quindi effettuato uno screening dei numerosi risultati ottenuti e confrontato queste informazioni con i dati di letteratura ed abbiamo selezionato un possibile target cellulare della S-nitrosilazione indotta dai trattamenti con nitriti e GSNO: il canale del potassio di tipo Kir 2.1. Abbiamo

quindi utilizzato un anticorpo Kir 2.1 rabbit polyclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology) per individuare la eventuale corrispondenza tra la banda di nitrosilazione ottenuta nel range di peso molecolare compreso tra 45-50 kDa ed il canale del potassio di tipo Kir 2.1. I risultati ottenuti hanno confermato questa corrispondenza (fig. 24).

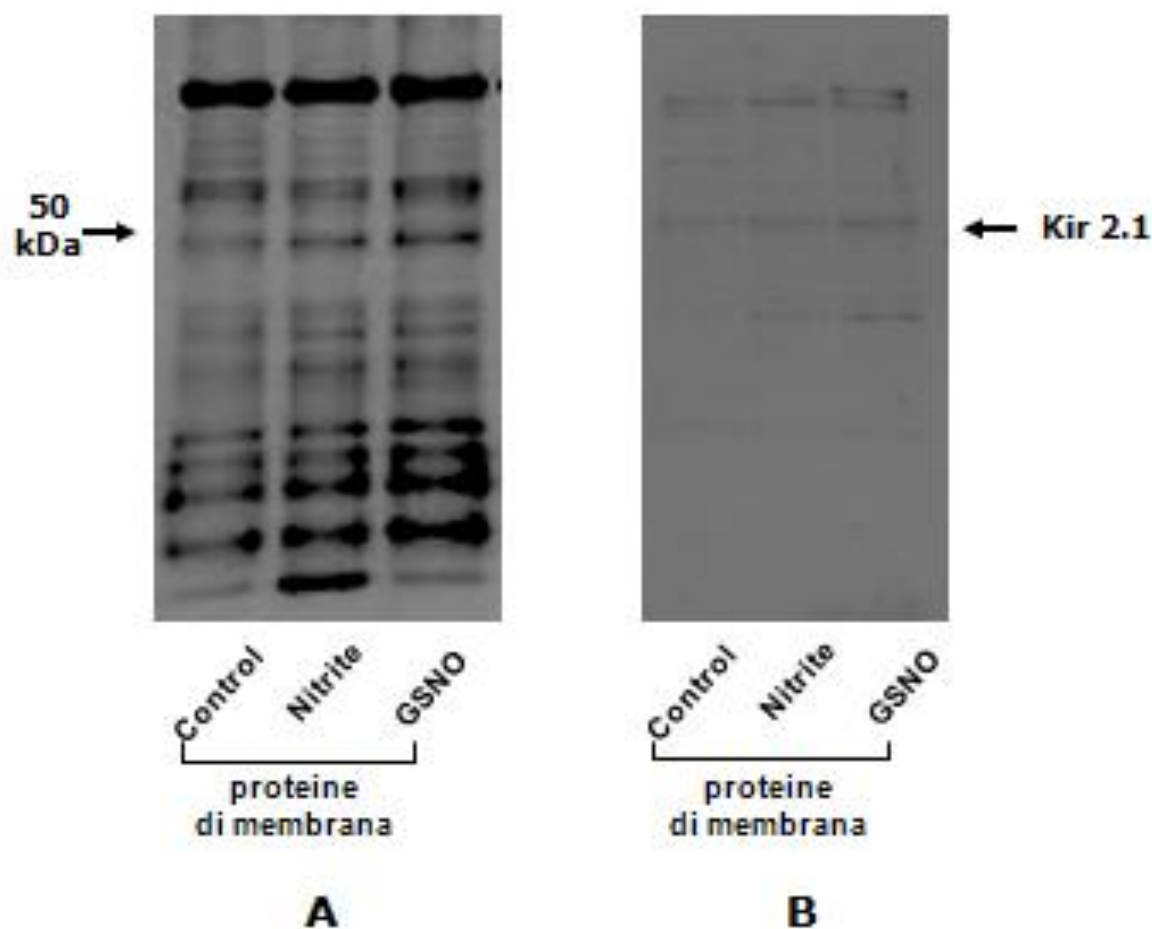


Fig. 24: (A) Western blotting delle proteine S-nitrosilate in cuore di ratto controllo e in seguito a trattamento con nitriti e GSNO. (B) Western blotting condotto utilizzando Anti-Kir 2.1 in cuore di ratto controllo e in seguito a trattamento con nitriti e GSNO.

Per chiarire se i nitriti rappresentino un agente capace di indurre direttamente S-nitrosilazione del canale Kir2.1 o inducono questi effetti attraverso la conversione a NO, abbiamo valutato le variazioni di S-nitrosilazione delle proteine comprese nel range di peso molecolare tra 45-50 kDa dopo singolo trattamento con nitriti, in

presenza di NO-scavenger P-TIO e in presenza di due NO-donatori (GSNO e NONOATE). I risultati ottenuti evidenziano come il trattamento con P-TIO non modifica il grado di S-Nitrosilazione delle proteine cardiache mentre l'effetto dei nitriti persiste in presenza di P-TIO anche se risulta leggermente attenuato (fig. 25).

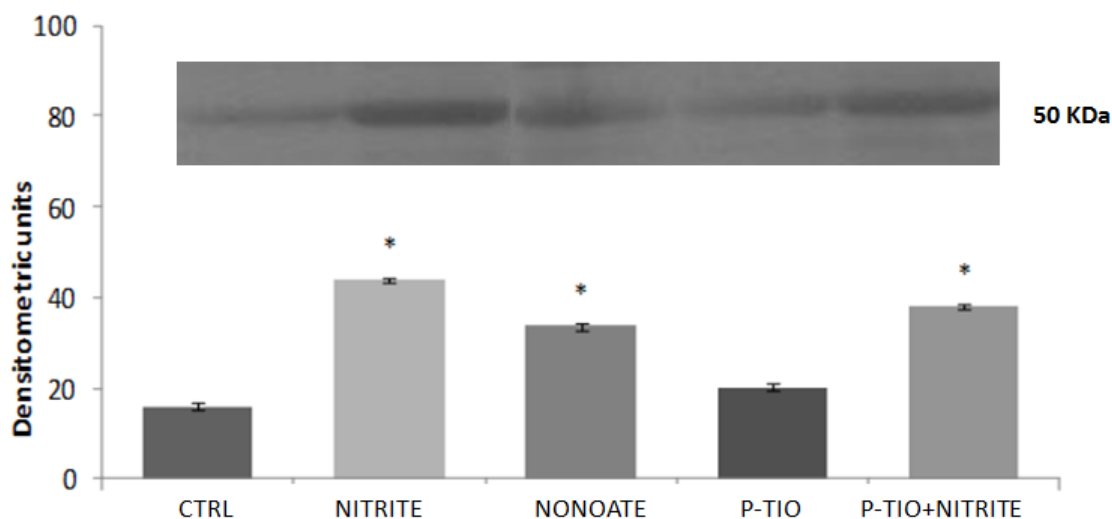


Fig. 25: Analisi densitometrica relativa a blots corrispondenti a 50 kDa contenenti la frazione di membrane biotilate di cuori controllo, perfusi con Nitriti (10^{-5} M), Nonoate (10^{-5} M), PTIO (10^{-5} M), PTIO+Nitriti (10^{-5} M). Le differenze significative rispetto al controllo sono state elaborate mediante Student's t test; * $p < 0.01$.

Infine, abbiamo voluto approfondire lo studio riguardo l'azione nitrosilante mediata direttamente dai nitriti. Per questo scopo i cuori sono stati perfusi con nitriti in presenza di inibitori delle principali nitrito-reduttasi: allopurinolo, specifico inibitore della xantina ossido reduttasi, e ketokonazolo, specifico inibitore del citocromo P-450. Dall'analisi densitometrica si evince che gli effetti nitrosilanti dei nitriti in presenza di questi inibitori sono lievemente attenuati rispetto al trattamento con i soli nitriti ma restano comunque significativamente aumentati rispetto al controllo suggerendo l'ipotesi che l'azione nitrosilante dei nitriti non è mediata, se non parzialmente, dalla riconversione nello NO. Per confermare questo risultato, i cuori sono stati perfusi con nitriti in presenza dello specifico inibitore di HNO, NAC. In questo caso al contrario di quanto ottenuto in presenza dello specifico NO-

scavenger, gli effetti dei nitriti sono significativamente ridotti suggerendo il possibile coinvolgimento di altre specie radicaliche risultanti dalla conversione dei nitriti nello NO (fig. 26).

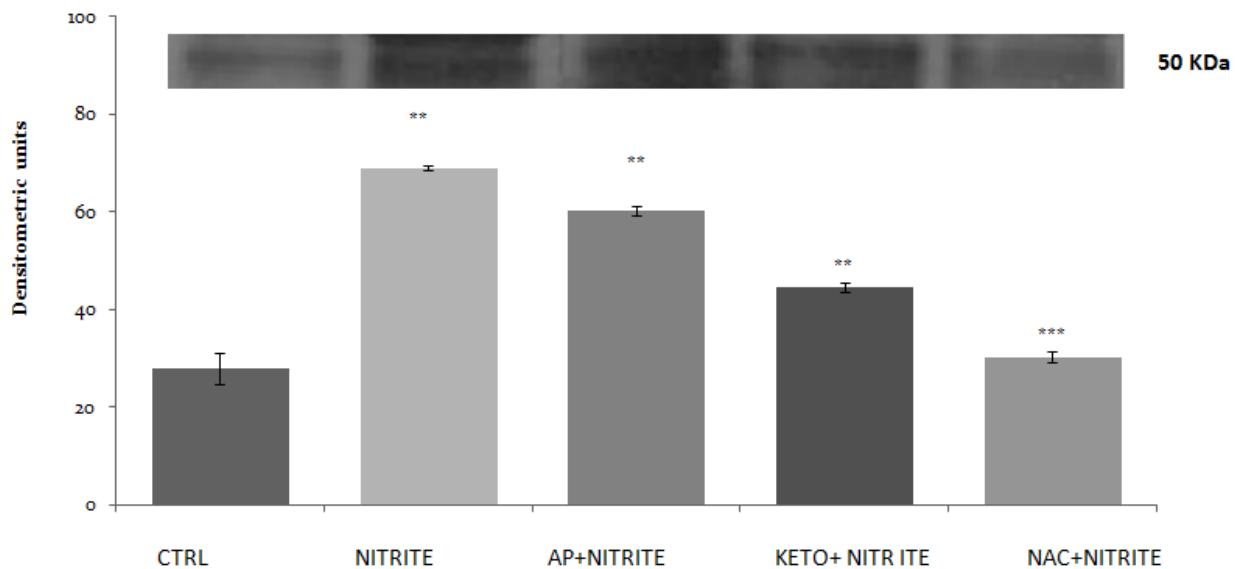


Fig. 26: Analisi densitometrica relativa a blots corrispondenti a 50 kDa contenenti la frazione di membrane biotilate di cuori controllo, perfusi con Nitriti (10^{-5} M), Nonoate (10^{-5} M), PTIO (10^{-5} M), PTIO+Nitriti (10^{-5} M). Le differenze significative rispetto al controllo sono state elaborate mediante Student's *t* test; * $p < 0.01$.

DISCUSSIONE

Lo scopo di questa ricerca è stato quello di approfondire le conoscenze sul ruolo fisiologico svolto dai nitriti sulla regolazione dell'attività cardiaca. Infatti, nonostante gli effetti cardioprotettivi dei nitriti siano noti da tempo (Marsh e Marsh, 2000), solo di recente i nitriti sono stati identificati come una riserva endocrina dello NO (Cosby et al., 2003).

La riduzione enzimatica dei nitriti ad NO avviene tipicamente in condizioni ipossiche (Cosby et al., 2003; Gladwin et al., 2005) e particolare importanza assume l'attività nitrito reduttasica della deossiHb poiché lo NO prodotto in questa reazione può partecipare nella regolazione del flusso sanguigno a seconda delle necessità (Cosby et al., 2003; Nagababu et al., 2003). Uno studio mirato sulla cinetica dell'interazione tra deossiHb e nitriti è stato condotto presso il Laboratorio di Fisiologia dell'università di Odense (Danimarca) dove è stato possibile effettuare esperimenti su *Myxine glutinosa* (hagfish) una specie ectoterma che periodicamente è esposta a condizioni ambientali ipossiche. I risultati di questi esperimenti hanno mostrato che la reazione tra nitriti ed Hb di hagfish in condizioni parzialmente ossigenate è favorita rispetto a quella con l'Hb ossigenata. Questi dati assumono particolare importanza in quanto mostrano che l'Hb di animali che facilmente sono in grado di tollerare condizioni ipossiche, è in grado di produrre una maggiore quantità dello NO a partire dai nitriti confermando il ruolo centrale di questa emoproteina nell'omeostasi nitriti/NO dell'organismo.

Oltre a fungere da riserva endocrina dello NO, i nitriti sono in grado di mediare direttamente risposte fisiologiche (Bryan et al., 2005). A livello cardiovascolare, questi anioni agiscono mimando gli effetti indotti dallo NO anche influenzando sia l'inotropismo che il lusitropismo miocardici. In questo studio, abbiamo dimostrato che i nitriti influenzano profondamente una proprietà fondamentale del miocardio, cioè la capacità di aumentare la contrattilità in risposta allo stretch (risposta di Frank-Starling).

La risposta di Frank-Starling è stata estesamente esaminata nel cuore di vari mammiferi (Komamura et al., 1993; Prendergast et al., 1997; Tucci et al., 1984) tra cui il ratto (Pagliaro et al., 2002; Piuhola et al., 2003; Stefanon et al., 1990). I roditori, a causa del loro particolare accoppiamento E/C accelerato, non rappresentano un modello ideale per studiare la risposta di Frank-Starling nei mammiferi. Tuttavia, sulla scorta delle nostre conoscenze sul ruolo cardiaco dei nitriti e dello NO in questa specie, nel presente studio è stato utilizzato il ratto come paradigma di cuore di mammifero. I risultati ottenuti hanno permesso di evidenziare che i nitriti regolano la risposta eterometrica influenzando positivamente la risposta di Frank-Starling grazie alla loro riconversione nello NO con conseguente attivazione del pathway sCG/cGMP/PKG. E' noto che, in associazione alla classica cascata trasduzionale cGMP/PKG, la risposta di Frank-Starling può essere modulata dai nitriti anche attraverso S-nitrosilazione di obiettivi specifici (Garofalo et al., 2009). L'attività nitrosilante rappresenta un meccanismo di regolazione estremamente importante con il quale i nitriti regolano fisiologicamente la funzione del cuore (Gomez et al., 2009) ad esempio, attraverso la diretta S-nitrosilazione delle proteine cardiache che contengono gruppi tiolici (Bryan et al., 2005). Nella seconda parte di questo studio l'attenzione è stata focalizzata sul ruolo dei nitriti come agenti S-nitrosilanti delle proteine cardiache ed in particolare è stato verificato che i nitriti agiscono direttamente come agenti nitrosilanti e non tramite la loro riconversione nello NO.

1. NO generato dai nitriti e la risposta Frank-Starling

In precedenti studi condotti nel nostro laboratorio (Cerra et al., 2009; Pellegrino et al., 2009) è stato dimostrato che, in condizioni basali, i nitriti sono in grado di influenzare l'attività cardiaca inducendo un effetto inotropo negativo in diverse specie, indipendentemente dalla diversa organizzazione della microarchitettura ventricolare e dell'organizzazione vascolare del preparato preso in esame, vale a dire, sia esso avascolare (rana), poco (anguilla) o riccamente vascolarizzato (ratto). In particolare, nel ratto, i nitriti rappresentano una importante fonte dello NO eNOS-indipendente che modula l'attività cardiaca tramite un meccanismo che coinvolge il pathway NO-cGMP-PKG (Pellegrino et al., 2009). Il fatto che nel ratto gli effetti mediati dai nitriti a livello del miocardio siano paragonabili a quelli indotti dall'esposizione cardiaca allo NO sottolinea ed enfatizza l'importanza della riduzione fisiologica dei nitriti e della loro funzione principale di storage dello NO nel cuore dei vertebrati. Per analizzare gli effetti dei nitriti sulla risposta di Frank-Starling è stato utilizzato come modello sperimentale il cuore di ratto isolato e perfuso in condizioni isovolumetriche secondo *Langendorff*. L'utilizzo di questa metodica consente un'analisi accurata dei parametri cardiaci relativi all'inotropismo ed al lusitropismo. Dai nostri esperimenti è risultato chiaro che in presenza di nitriti si ha un notevole miglioramento della risposta di Frank-Starling come dimostrato dall'analisi dei parametri cardiaci presi in esame, LVP, LVDP/dt max ed in particolare LVDP/dt min, il che suggerisce il coinvolgimento dei nitriti non solo nella fase sistolica ma anche in quella diastolica. Paragonando l'entità dell'effetto di miglioramento alla risposta eterometrica del cuore con i dati relativi all'attività dei nitriti (alle stesse concentrazioni, 10^{-8} M) in condizioni basali, si nota che l'effetto è notevolmente potenziato ad aumentati valori di precarico. Questo può essere correlato al rilascio intracardiaco stretch-indotto dello NO (Petroff et al., 2001) e/o del peptide

natriuretico cGMP-dipendente (Laskowski et al., 2006). E' noto da tempo che, sebbene eserciti un noto inotropismo negativo, lo NO migliora in modo significativo la risposta di Frank-Starling attraverso meccanismi diversi (Prendergast et al., 1997). L'attivazione del pathway cGMP-PKG NO-dipendente, attraverso fosforilazione della troponina I e conseguente riduzione dell'affinità della troponina C per il Ca^{2+} , regola negativamente la contrattilità cardiaca, invece, la modulazione NO-dipendente delle pompe SERCA2a determina il rapido adattamento delle fibre muscolari e di conseguenza della contrattilità miocardica in risposta ai cambiamenti di precarico (Massion et al., 2005). In particolare, il rilassamento miocardico NO-dipendente è associato ad un aumento della ricaptazione del Ca^{2+} , a livello del reticolo sarcoplasmatico, indotto dalle pompe SERCA2a (Massion et al., 2005; Zhang et al., 2008). Pertanto, il signaling dello NO può attivare, in maniera spazio-temporale-dipendente, diversi target intracellulari in grado di mediare risposte distinte all'interno dello stesso tipo di cellula. Le differenze significative ottenute nelle curve di Frank-Starling in presenza di nitriti rispetto ai controlli, evidenziano l'implicazione di questi anioni nella regolazione eterometrica, sostenendo con forza l'idea che i nitriti agiscono come una fonte endogena dello NO non solo in condizioni basali, ma anche durante l'aumento dello stretch del miocardio. Questo è supportato dalla constatazione che il miglioramento della risposta di Frank-Starling mediato dai nitriti è stato inibito in seguito a trattamento con lo NO-scavenger, PTIO. Ad ulteriore verifica di ciò sono stati analizzati anche altri aspetti. Durante la riconversione dei nitriti ad NO si forma un intermedio altamente reattivo, lo HNO, potente ossidante e agente S-nitrosilante, che può essere generato sia da fonti NOS-dipendenti che indipendenti (Wink et al., 2003). A livello miocardico, HNO induce un effetto inotropo opposto rispetto a quello dello NO, poiché, a differenza del generale inotropismo negativo indotto dallo NO, aumenta la contrattilità (Irvine et al., 2008). I risultati ottenuti

mostrano che la modulazione della risposta di Frank-Starling mediata dai nitriti è insensibile all'azione di NAC, uno HNO scavenger specifico, suggerendo che la riduzione dei nitriti a nitrosile non è coinvolta nella regolazione della risposta di Frank-Starling. Tuttavia, a causa delle proprietà antiossidanti di NAC (Wink et al., 2003; Irvine et al., 2008), la specificità di questa risposta rimane da confermare. Nel loro insieme, questi dati sostengono fortemente l'idea che una migliore risposta di Frank-Starling mediata dai nitriti è causata direttamente dalla produzione intracardiaca dello NO tramite conversione di questi anioni.

2. Meccanismi di traduzione del segnale nitriti-NO

A livello cardiaco, la riduzione dei nitriti a NO può avvenire sia attraverso meccanismi enzimatici che non enzimatici, entrambi controllati dai valori di pH, dalla tensione di ossigeno, dai livelli di nitriti, e dalla disponibilità dei substrati riducenti. I meccanismi enzimatici alla base della riduzione dei nitriti includono pathways NOS-dipendenti e indipendenti (Rassaf et al., 2007; Shiva et al., 2007). In particolare la eNOS è risultata essere una importante nitrito redattasi in situazioni di blocco della sua attività catalitica (Gautier et al., 2006). Studi precedenti effettuati sempre nel nostro laboratorio hanno evidenziato che l'attività dei nitriti, in condizioni basali, è NOS-indipendente (Pellegrino et al., 2009). Per confermare questi dati anche nei cuori sottoposti ad incremento di precarico in presenza di nitriti, abbiamo ripetuto le curve di Frank-Starling in presenza sia di nitriti che di L-NAME, un inibitore competitivo delle NOSs. Dai risultati ottenuti non sono state rilevate variazioni nella risposta di Frank-Starling nitriti-dipendente il che indica che, nel cuore di ratto, proteine diverse dalle NOSs e contenenti gruppi eme (xantina ossido-reduttasi, deossi-Mb, enzimi mitocondriali di trasporto degli elettroni, citocromo P-450) possono essere coinvolte nella produzione

dello NO a partire dai nitriti in condizioni aerobiche anche se la loro partecipazione resta da chiarire. In cuori di anguille, rane, e ratto, l'attivazione del pathway trasduzionale dello NO modula la performance cardiaca attraverso un aumento NO-dipendente dei livelli di cGMP, sia in condizioni basali che in cuori stimolati chimicamente (Imbrogno et al., 2011; Seddon et al., 2007). Diversi studi suggeriscono che entrambi i meccanismi cGMP-dipendente e indipendente influenzano la risposta cardiaca di Frank-Starling mediata dallo NO. Lo NO attiva la sGC legandosi alla sua porzione eme con conseguente produzione di cGMP il quale induce la desensibilizzazione dei miofilamenti al Ca^{2+} , e quindi un maggiore rilassamento miocardico (Layland et al., 2002; Prendergast et al., 1997). Inoltre lo NO, attraverso meccanismi cGMP-indipendenti, potrebbe modulare l'aumento della forza contrattile indotto da variazioni di precarico mediante la reazione diretta con residui tiolici di diverse proteine (Hess et al., 2005). Questi meccanismi cGMP-dipendenti e indipendenti sono stati correlati alla diversa compartimentazione delle isoforme delle NOSs, nonché alle differenze nella loro modalità di stimolazione. È ora generalmente accettato che oltre alla eNOS localizzata a livello coronarico (azione paracrina), sia la eNOS che l'isoforma neuronale (nNOS) sono costitutivamente espresse in distinte posizioni subcellulari all'interno dei cardiomiociti (azione autocrina; Seddon et al., 2007). Evidenze sperimentali suggeriscono che la eNOS media la risposta inotropa attraverso un meccanismo che prevede la S-nitrosilazione di residui tiolici dei canali di rilascio del Ca^{2+} dei recettori rianodinici (Massion et al., 2005), mentre la nNOS, osservata per la prima volta nel reticolo sarcoplasmatico (SR) (Xu et al., 1999) e successivamente a livello del sarcolemma delle proteine di membrana (Williams et al., 2006), promuove il rilassamento ventricolare attraverso sia la fosforilazione del fosfolambano (PLN) PKA-mediata che attraverso la velocità del reuptake del Ca^{2+}

tramite la Ca^{2+} -ATPasi (SERCA2a) a livello del RS (Zhang et al., 2008). Recenti evidenze sperimentali hanno dimostrato che lo NO prodotto dalla eNOS influenza la risposta di Frank-Starling, inducendo una regolazione beat-to-beat del reuptake del Ca^{2+} e quindi del rilassamento miocardio. Ciò avviene attraverso un meccanismo trasduzionale che, indipendentemente dal pathway cGMP/PKG, comporta una modulazione del reuptake del Ca^{2+} attraverso S-nitrosilazione del PLN (Garofalo et al., 2009). Per quanto riguarda i meccanismi di traduzione del segnale nitriti-NO, i nostri risultati indicano che gli effetti cardiaci mediati dai nitriti sulla risposta del meccanismo di Frank-Starling coinvolgono l'attivazione del pathway cGMP-PKG. Infatti, l'entità della risposta di Frank-Starling in presenza di nitriti è influenzata dal pretrattamento sia con l'inibitore della sGC (ODQ) che con l'antagonista della PKG (KT5823). Poiché ODQ è un potente inibitore di sGC ma anche un ossidante delle proteine contenenti gruppi eme (Alzawahra et al., 2008; Gladwin et al., 2005), è possibile che la risposta di Frank-Starling ottenuta in seguito a co-somministrazione di nitriti e ODQ possa derivare anche dall'inibizione della conversione dei nitriti nello NO mediata dalle emoproteine cardiache in condizioni aerobiche.

3. S-nitrosilazione delle proteine cardiache

Il presente studio, per la prima volta, ha dimostrato che i nitriti rappresentano un agente S-nitrosilante diretto delle proteine cardiache. Queste osservazioni assumono un'importanza notevole dal momento che diverse evidenze sperimentali hanno messo in luce come i nitriti non rappresentino solo una riserva intravascolare dello NO, ma essi stessi sono in grado di modulare direttamente importanti proteine funzionali cardiache. L'analisi di estratti di cuore di ratto isolato e perfuso secondo *Langendorff* esposti a dosi farmacologiche di nitriti mostra un aumento del livello totale di S-nitrosilazione delle

proteine cardiache. E' ben noto che i prodotti bioattivi delle NOSs, principalmente lo NO e S-nitrosotoli a basso peso molecolare (SNO_s), regolano una vasta gamma di vie di trasduzione del segnale, che agiscono principalmente attraverso la modificazione covalente (S-nitrosilazione) di residui di cisteina situati in siti attivi o allosterici delle proteine (Hess et al., 2005). Nel cuore, questa reazione è implicata in diversi processi patologici, quali ischemia, insufficienza cardiaca e fibrillazione atriale (Shi et al., 2008). Come già riportato (Cosby et al., 2003; Duranski et al., 2005; Webb et al., 2004), i nitriti mediano i loro effetti soprattutto attraverso la loro conversione nello NO. Di conseguenza, abbiamo valutato gli effetti dei nitriti confrontandoli con quelli ottenuti in seguito a somministrazione di GSNO, un donatore dello NO ampiamente usato anche come agente S-nitrosilante *in vitro* (Shi et al., 2008). Utilizzando il Biotin Switch Assay per rilevare le proteine S-nitrosilate, abbiamo osservato che entrambi i trattamenti con nitriti e GSNO aumentato il grado di S-nitrosilazione, un effetto che può essere osservato soprattutto a livello delle proteine di membrana. Diverse proteine cardiache sono obiettivi di S-nitrosilazione, in particolare, molti canali ionici sono stati identificati come target di questa reazione attraverso cui viene alterata la loro attività e/o la loro funzionalità. (Sun et al., 2007; 2006). Ad esempio, è stato dimostrato che i canali L-Type per il Ca²⁺ e il complesso I della catena respiratoria mitocondriale sono targets della reazione di S-nitrosilazione e questo sembra conferire un effetto protettivo contro danni da I/R (Nadtochiy et al., 2007; Sun et al., 2007). Inoltre, la S-nitrosilazione modula i canali per il Ca²⁺ e per il K⁺ e quelli per la ricaptazione del Ca²⁺, regolando le pompe SERCA2a tramite S-nitrosilazione del PLN.

Utilizzando un gradiente di concentrazione lineare di saccarosio abbiamo ottenuto le singole frazioni di membrana di cuori controllo, cuori trattati con nitriti e GSNO; ciò ci ha consentito di valutare i livelli di S-nitrosilazione in maniera più selettiva al fine di

individuare i targets specifici della S-nitrosilazione. I risultati ottenuti mostrano un marcato incremento di S-nitrosilazione sia dopo trattamento con nitriti che con GSNO soprattutto per quanto riguarda le proteine contenute nella frazione delle membrane plasmatiche con peso molecolare compreso tra 45-50 kDa. Ciò ci ha permesso di restringere il campo dei potenziali target che in seguito abbiamo identificato nel canale ionico Kir2.1 tramite tecniche di immunoblotting. È noto infatti che la regolazione di numerosi canali ionici possa avvenire attraverso la nitrosilazione diretta di proteine che formano il canale. I canali sensibili all'azione nitrosilante dello NO includono i recettori canali NMDA (Lei et al., 1992), i canali del K⁺ attivati dal calcio (Bolotina et al., 1994), i canali per i nucleotidi ciclici (Broillet et al., 1996;1997), i canali del sodio nei baro recettori (Li et al., 1998) ed i canali del Ca²⁺ a livello cardiaco (Xu et al., 1998). Recentemente, Gomez e collaboratori (2009) hanno riportato che lo NO, in condizioni fisiologiche, aumenta le correnti I_{Kir 2.1}, mediante la nitrosilazione della cisteina in posizione 76 del canale Kir 2.1, sia per quanto riguarda l'atrio umano che il ventricolo di topo. Le correnti I_{Kir 2.1} giocano un ruolo chiave nell'elettrofisiologia cardiaca stabilizzando il potenziale di membrana a riposo e la fase iniziale e finale del potenziale d'azione atriale e ventricolare (Lopatin e Nichols, 2001). Pertanto, la modulazione di queste correnti ioniche esercita profondi effetti sulla eccitabilità cardiaca e sull'aritmogenesi (Dhamoon e Jalife, 2005). Poiché, sia da un punto di vista qualitativo che quantitativo, non è stata osservata nessuna differenza significativa in cuori trattati con nitriti e GSNO, i risultati ottenuti suggeriscono che l'aumento delle proteine S-nitrosilate è mediato dallo NO e non coinvolge meccanismi NO-indipendenti. Per chiarire questo punto, abbiamo ripetuto gli esperimenti trattando i cuori con due diversi donatori dello NO, GSNO e NONOATE, e con uno scavenger dello NO, lo PTIO. I risultati hanno dimostrato che la S-nitrosilazione indotta dai nitriti rilevata nella banda

proteica con peso molecolare corrispondente al canale Kir 2.1 persiste in seguito al trattamento con P-TIO, anche se leggermente attenuata. Questi risultati sono importanti perché implicano che la S-nitrosilazione indotta dai nitriti è in gran parte NO-indipendente e per approfondire questo aspetto i cuori sono stati perfusi con nitriti in presenza di inibitori delle principali nitrito-reduttasi: allopurinolo, specifico inibitore della xantina ossido reduttasi, e ketokonazolo, specifico inibitore del citocromo P-450. Diverse evidenze sperimentali hanno dimostrato che in presenza di allopurinolo si ha la soppressione della produzione dello NO a partire dai nitriti attraverso una reazione che dipende dall'attività della xantina ossidoreduttasi (Webb et al., 2004). L'inibizione dell'attività nitrito reduttasica della xantina ossido reduttasi mediata dall'allopurinolo è stata riportata anche nel topo (Amin et al., 2012). Il ketoconazolo inibisce il citocromo P450 legandosi alla componente del complesso citocromo monoossigenasi (Sheets e Mason, 1984), interferendo così con l'ossidazione citocromo-mediata (Meredith et al., 1985). I risultati ottenuti in questo lavoro mostrano che gli effetti nitrosilanti dei nitriti in presenza di questi inibitori sono lievemente attenuati rispetto al trattamento con i soli nitriti ma restano comunque significativamente aumentati rispetto al controllo supportando l'ipotesi che l'azione nitrosilante dei nitriti non è mediata, se non parzialmente, dalla riconversione nello NO. Considerando che la produzione dello NO a partire dai nitriti porta alla formazione di altri intermedi di reazione quali HNO, HNO₂, N₂O₃, tutti potenti agenti nitrosilanti (Foster et al., 2003) abbiamo perfuso i cuori con nitriti in presenza di NAC, uno specifico inibitore di HNO. In questo caso, gli effetti nitrosilanti mediati dai nitriti sono stati significativamente ridotti suggerendo il possibile coinvolgimento di specie radicaliche intermedie risultanti dalla conversione dei nitriti nello NO.

In conclusione, questa ricerca ha approfondito le conoscenze sul ruolo fisiologico svolto dai nitriti sulla regolazione dell'attività cardiaca. In particolare possiamo affermare che nei cuori sottoposti ad incrementi di precarico, i nitriti esogeni agiscono come un agente paracrino aumentando la disponibilità dello NO che diffonde nella cellula miocardica attivando la cascata trasduzionale sGC-PKG.

La dimostrazione che i nitriti siano un modulatore positivo eterometrico miocardico fornisce ulteriori prove sulla sua ubiquitaria funzione cardiaca. In maniera specifica la contrattilità miocardica migliorata dai nitriti, basata sulla interdipendenza di diversi fattori, potrebbe rappresentare una parte rilevante dello scenario cardioprotettivo proposto per questi anioni. Ciò potrebbe essere di particolare interesse in stati patologici caratterizzati da dilatazione ventricolare (ad esempio arresto cardiaco) o diminuita modulazione autonoma del cuore accompagnata da un aumentato post-carico (come accade nei soggetti anziani).

In aggiunta, i nostri dati hanno confermato che la S-nitrosilazione è un meccanismo attraverso cui i nitriti sono in grado di regolare direttamente l'attività di proteine cardiache implicate in vari processi biologici e questo è di particolare importanza alla luce del ruolo emergente dei nitriti nella terapia delle patologie del sistema cardiovascolare. Il nitrito di sodio, composto altamente stabile e di facile somministrazione, rappresenta un ottimo donatore dello NO in quanto lo rilascia soprattutto in tessuti ischemici/ipossici ed è attualmente al centro di numerosi studi clinici. Proprio per questo è importante analizzare i vari aspetti degli effetti dei nitriti poiché questi anioni non sono solo una riserva dello NO ma rappresentano un agente bioattivo direttamente coinvolto in diversi processi fisiologici e patologici. La coesistenza di due sistemi di produzione fisiologica dello NO (NOS e conversione dei nitriti) suggerisce che le azioni cito-protettive dei nitriti non sono limitate ad eventi

ischemici, ma che i nitriti svolgono una funzione critica distinta da quella svolta dallo NO prodotto dalle NOSs e agiscono attraverso meccanismi diversi, anche in condizioni fisiologiche. Questo studio rappresenta quindi un punto di partenza per la comprensione dei potenziali meccanismi diretti con i quali i nitriti regolano fisiologicamente la funzione del cuore.

BIBLIOGRAFIA

Adachi T, Weibrod RM, Pimentel DR, Ying J, Sharov VS, Schoneich C, Cohen RA (2004). S-glutathiolation by peroxynitrite activates SERCA during arterial relaxation by nitric oxide. *Nat Med*, **10**: 1200–1207.

Aggergaard S, Jensen F.B. (2001). Cardiovascular changes and physiological response during nitrite exposure in rainbow trout. *J Fish Biol*, **59**: 13-27.

Alef MJ, Vallabhaneni R, Carchman E, Morris SM Jr, Shiva S, Wang Y, Kelley EE, Tarpey MM, Gladwin MT, Tzeng E, Zuckerbraun BS (2011). Nitrite-generated NO circumvents dysregulated arginine/NOS signaling to protect against intimal hyperplasia in Sprague-Dawley rats. *J Clin Invest*, **121(4)**: 1646-1656.

Allen DG, and Kurihara S (1982). The effects of muscle length on intracellular calcium transients in mammalian cardiac muscle. *J Physiol*, **327**: 79-94.

Allen D, and Kentish J (1985). The cellular basis of the length-tension relation in cardiac muscle. *J Mol Cell Cardiol*, **9**: 821-840.

Alzawahra WF, Talukder MA, Liu X, Samouilov A, Zweier JL (2008). Heme proteins mediate the conversion of nitrite to nitric oxide in the vascular wall. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **295**: H499–H508.

Amin A, Choi SK, Osman-Elazeik Y, Badr El-Din NK, Kevil CG, Navar LG, Kadowitz P, Trebak M, Matrougui K (2012). Sodium nitrite therapy rescues ischemia-induced neovascularization and blood flow recovery in hypertension. *Pflugers Arch*, (Epub ahead of print)

Amrani M, O'Shea J, Allen NJ, Harding SE, Jayakumar J, Pepper JR, Moncada S, Yacoub MH (1992). Role of basal release of nitric oxide on coronary flow and mechanical performance of the isolated rat heart. *J Physiol*, **456**: 681–687.

Arnelle DR, Day BJ, Stamler JS (1997). Diethyl dithiocarbamate-induced decomposition of S-nitrosothiols. *Nitric Oxide*, **1**: 56–64.

Arnold WP, Aldred R, Murad F (1977). Cigarette smoke activates guanylate cyclase and increases guanosine 3',5'-monophosphate in tissues. *Science*, **198**: 934-936.

Åsnes CF, Marquez JP, Elson EL, Wakatsuki T (2006). Reconstitution of the Frank–Starling mechanism in engineered heart tissues. *Biophys J*, **91**: 1800- 1810.

Baker JE, Su J, Fu X, Hsu A, Gross G.J, Tweddell J.S, Hogg N (2007). Nitrite confers protection against myocardial infarction: role of xanthine oxidoreductase, NADPH oxidase and K(ATP) channels. *J Mol Cell Cardiol*, **43**: 437-444.

Balligand JL, Feron O, DessyC.(2009). eNOS activation by physical forces: from short-term regulation of contraction to chronic remodeling of cardiovascular tissues. *Physiol Rev*, **89**: 481–534.

Bartfly WJ, Dawood F, Wen WH, Lehotay DC, Hou D, Bartfly E, Lou X, Backx PH, Liu PP (1999). Cardiac function and cytotoxic aldehyde production in a murine model of chronic iron-overload. *Cardiovasc Res*, **43**: 892-900.

Beckmann JS, Ye YZ, Anderson PG, Chen J, Accavitti MA., Tarpey MM., White CR (1994). Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry. *Biol Chem Hoppe Seyler*, **375**: 81–88.

Benjamin N, O’Driscoll F, Dougall H, Duncan C, Smith L, Golden M, McKenzie H. (1994). Stomach NO synthesis. *Nature*, **368**: 502.

Bolli R (2001). Cardioprotective function of inducible nitric oxide synthase and role of nitric oxide in myocardial ischemia and preconditioning: an overview of a decade of research. *J Mol Cell Cardiol*, **33**: 1897-1918.

Bolotina VM, Najibi S, Palacino J, Pagano P, Cohen RA (1994). Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature*, **368**: 850–853.

Broillet MC (1999). S-Nitrosylation of proteins. *Cell Mol Life Sci*, **55**: 1036–1042.

Broillet MC and Firestein S (1996). Direct activation of the olfactory cyclic nucleotide-gated channel through modification of sulfhydryl groups by NO compounds. *Neuron*, **16**: 377–385.

Broillet MC and Firestein S (1997). β subunits of the olfactory cyclic nucleotide-gated channel form a nitric oxide activated Ca^{2+} channel. *Neuron*, **18**: 951–958.

Brooks SC (1937). Osmotic effects of deuterium oxide (heavy water) on living cells. *Science*, **86**: 497-498.

Brunori M (2001). Nitric oxide moves myoglobin centre stage. *Trends Biochem. Science*, **26**: 209-210.

Bryan NS (2006). Nitrite in nitric oxide biology: cause or consequence? A systems-based review. *Free Radic Biol Med*, **41(5)**: 691-701.

Bryan NS, Fernandez BO, Bauer SM, Garcia-Saura MF, Milsom AB, Rassaf T, Maloney RE, Bharti A, Rodriguez J, Feelisch M (2005). Nitrite is a signaling molecule and regulator of gene expression in mammalian tissues. *Nat Chem Biol*, **1**: 290-297.

Bryan NS, Calvert JW, Elrod JW, Gundewar S, Ji SY, Lefer DJ (2007). Dietary nitrite supplementation protects against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci USA*, **104**: 19144-19149.

Cannon RO, Schechter AN, Panza JA, Ognibene FP, Pease-Fye ME, Waclawiw MA, Shelhamer JH, Gladwin MT (2001). Effects of inhaled nitric oxide on regional

blood flow are consistent with intravascular nitric oxide delivery. *J Clin Invest*, **108**: 279-287.

Casadei B and Sears CE. (2003). Nitric-oxide-mediated regulation of cardiac contractility and stretch responses. *Prog Biophys Mol Biol*, **82**: 67–80.

Castello PR, David PS, McClure T, Crook Z, Poyton RO (2006). Mitochondrial cytochrome oxidase produces nitric oxide under hypoxic conditions: implications for oxygen sensing and hypoxic signaling in eukaryotes. *Cell Cardiol*, **33**: 625–638.

Cerra MC, De Iuri L, Angelone T, Corti A, Tota B (2006). Recombinant N-terminal fragments of chromogranin-A modulate cardiac function of the Langendorff-perfused rat heart. *Basic Res Cardiol* **101** :43-52.

Cerra MC, Angelone T, Parisella M.L, Pellegrino D, Tota B (2009). Nitrite modulates contractility of teleost (*Anguilla anguilla* and *Chionodraco hamatus*, i.e. the Antarctic hemoglobinless icefish) and frog (*Rana esculenta*) hearts. *Biochim Biophys Acta*, **1787**: 849-55.

Cheng CH and Detrich HW (2007). Molecular ecophysiology of Antarctic notothenioid fishes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **362 (1488)**: 2215-2232.

Cosby K, Partovi K.S, Crawford JH, Patel RP, Reiter CD, Martyr S, Yang BK, Waclawiw MA, Zalos G, Xu X, Huang KT, Shields H, Kim-Shapiro DB, Schechter AN, Cannon RO, Gladwin MT (2003). Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. *Nat Med*, **9**: 1498-1505.

Crawford JH, Isbell TS, Huang Z, Shiva S, Chacko BK, Schechter AN, Darley-Usmar VM, Kerby JD, Lang Jr JD, Kraus D, Ho C, Gladwin MT, Patel RP (2006). Hypoxia, red blood cells, and nitrite regulate NO-dependent hypoxic vasodilation. *Blood*, **10**: 566-574.

Cutruzzolà F, Rinaldo S, Castiglione N, Giardina G, Pecht I, Brunori M. Bioessays (2009). Nitrite reduction: a ubiquitous function from a pre-aerobic past. *BioEssays*, **31**: 885–891.

Dhamoon AS and Jalife J (2005). The inward rectifier current (IK1) controls cardiac excitability and is involved in arrhythmogenesis. *Heart Rhythm*, **3**: 316-324.

Di Maio A and Block BA (2008). Ultrastructure of the sarcoplasmic reticulum in cardiac myocytes from Pacific bluefin tuna. *Cell Tissue Res*, **334**: 121–134.

Doring HJ (1990). The Isolated perfused heart according to Langendorff technique-function-application. *Physiol Bohemoslov* **39**: 481-504.

Doyle MP, Pickering RA, DeWeert TM, Hoekstra JW, Pater D (1981). Kinetics and mechanism of the oxidation of human deoxyhemoglobin by nitrites. *J Biol Chem*, **256**: 12393-12398.

Duranski MR, Greer JJ, Dejam A, Jaganmohan S, Hogg N, Langston W, Patel RP, Yet SF, Wang X, Kevil CG, Gladwin MT, Lefer DJ(2005). Cytoprotective effects of nitrite during in vivo ischemia–reperfusion of the heart and liver. *J Clin Invest*, **115**: 1232-1240.

Eu JP, Sun J, Xu L, Stamler JS, Meissner G (2000). The skeletal muscle calcium release channel: coupled O₂ sensor and NO signaling functions. *Cell*, **102**: 499–509.

Fabiato A and Fabiato F (1975). Dependence of the contractile activation of skinned cardiac cells on the sarcomere length. *Nature*, **256**: 54-56.

Ferdinandy P, Panas D, Schulz R (1999). Peroxynitrite contributes to spontaneous loss of cardiac efficiency in isolated working rat hearts. *Am J Physiol*, **276**: 1861-1867.

Ferrari R, Cargnoni A, Bernocchi P, Pasini E, Curello S, Ceconi C, Ruigrok TJ (1996). Metabolic adaptation during a sequence of no-flow and low-flow ischemia. A possible trigger for hibernation. *Circulation*, **94**: 2587-2596.

Flögel U, Gödecke A, Klotz LO, Schrader J (2004). Role of myoglobin in the antioxidant defense of the heart. *FASEB J*, **18**: 1156-1158.

Foster MW, Hess DT, Stamler JS, (2009). Protein S-nitrosylation in health and disease: a current perspective. *Trends Mol Med*, **15(9)**: 391-404.

Foster MW, McMahon TM, Stamler JS (2003). S-nitrosylation in health and disease. *Trends Mol Med*, **9**: 160-168.

Furchgott RF and Bhadrakom S (1953). Reactions of strips of rabbit aorta to epinephrine, isopropylarterenol, sodium nitrite and other drugs. *J Pharmacol Exp Ther*, **108**: 129-43.

Gangolli SD, van den Brandt PA, Feron VJ, Janzowsky C, Koeman JH, Speijers GJ, Spiegelhalder B, Walker R, Wisnok JS (1994). Nitrate, nitrite and N-nitroso compounds. *Eur J Pharmacol*, **292(1)**: 1-38.

Garofalo F, Parisella ML, Amelio D, Tota B, Imbrogno S (2009). Phospholamban S-nitrosylation modulates Starling response in fish heart. *Proc Biol Sci*, **276**: 4043–4052.

Gattuso A, Mazza R, Pellegrino D, Tota B (1999). Endocardial endothelium mediates luminal ACh-NO signaling in isolated frog heart. *Am J Physiol*, **276**: 633-641.

Gautier C, van Faassen E, Mikula I, Martasek P, Slama-Schwok A. (2006). Endothelial nitric oxide synthase reduces nitrite anions to NO under anoxia. *Biochem Biophys Res Commun*, **341**: 816-821.

Gelpi RJ, Morales C, Cohen MV, Downey JM (2002). Xanthine oxidase contributes to preconditioning's preservation of left ventricular developed pressure in isolated rat

heart: developed pressure may not be an appropriate end-point for studies of preconditioning. *Basic Res Cardiol*, **97**: 40-46.

Gladwin MT, Crawford JH, Patel RP (2004). The biochemistry of nitric oxide, nitrite, and hemoglobin: role in blood flow regulation. *Free Radic Biol Med*, **36**: 707-717.

Gladwin MT (2004). Haldane, hot dogs, halitosis, and hypoxic vasodilation: the emerging biology of the nitrite anion. *J Clin Invest*, **113**: 19-21.

Gladwin MT (2005). Nitrite as an intrinsic signaling molecule. *Nat Chem Biol*, **1**: 245-246.

Gladwin MT, Shelhamer JH, Schechter AN, Pease-Fye ME, Waclawiw MA, Panza JA, Ognibene FP, Cannon RO (2000). Role of circulating nitrite and S-nitrosohemoglobin in the regulation of regional blood flow in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97(21)**: 11482-11487.

Goaz PW and Biswell HA (1961). Nitrite reduction in whole saliva. *J Dent Res*, **40**: 355-365.

Godber BL, Doel J, Sapkota GP, Blake DR, Stevens CR, Eisenthal R, Harrison R (2000). Reduction of nitrite to nitric oxide catalyzed by xanthine oxidoreductase. *J Biol Chem*, **275**: 7757-7763.

Gómez R, Caballero R, Barana A, Amorós I, Calvo E, López JA, Klein H, Vaquero M, Osuna L, Atienza F (2009). Nitric Oxide Increases Cardiac IK1 by Nitrosylation of Cysteine 76 of Kir2.1 Channels. *Circ Res*, **105**: 383-392.

Gonzales RJ, Bryant JM, Naik JS, Resta TC, Walker BR (2008). The ubiquitous role of nitric oxide in cardioprotection. *Microcirculation*, **15**: 473-483.

Gordon AM, Homsher E, Regnier M (2001). Regulation of contraction in striated muscle. *Physiol Rev*, **80**: 853-924.

Gottlieb RA, Burleson KO, Kloner RA, Babior BM, Engler RL (1994). Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest*, **94**: 1621-1628.

Gow AJ, Buerk DG, Ischiropoulos H (1997). A novel reaction mechanism for the formation of S-nitrosothiol in vivo. *J Biol Chem*, **272**: 2841–2845.

Gutierrez JA, Clark SG, Giulumian AD, Fuchs LC (1997). Superoxide anions contribute to impaired regulation of blood pressure by nitric oxide during the development of cardiomyopathy. *J Pharmacol Exp Ther*, **282**: 1643–1649.

Hagiwara S and Takahashi K (1974). The anomalous rectification and cation selectivity of the membrane of a starfish egg cell. *J Membr Biol*, **18(1)**: 61-80.

Harrison R (2002). Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radic Biol Med*, **33**: 774-797.

Hendgen-Cotta UB, Merx MW, Shiva S, Schmitz J, Becher S, Klare JP, Steinhoff HJ, Goedecke A, Schrader J, Gladwin MT, Kelm M, Rassaf T (2008). Nitrite reductase activity of myoglobin regulates respiration and cellular viability in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci*, **105**: 10256-10261.

Hess DT, Matsumoto A, Kim SO, Marshall H, EStamler JS (2005). Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6(2)**: 150-166.

Hill KE, Hunt RW Jr, Jones R, Hoover RL, Burk RF (1992). Metabolism of nitroglycerin by smooth muscle cells. Involvement of glutathione and glutathione S-transferase. *Biochem Pharmacol*, **43**: 561-566.

Huang KT, Keszler A, Patel N, Patel RP, Gladwin MT, Kim-Shapiro DB, Hogg N (2005a). The reaction between nitrite and deoxyhemoglobin. Reassessment of reaction kinetics and stoichiometry. *J Biol Chem*, **280**: 31126–31131.

Huang Z, Shiva S, Kim-Shapiro DB, Patel RP, Ringwood LA, Irby CE, Huang KT, Ho C, Hogg N, Schechter AN, Gladwin MT (2005b). Enzymatic function of hemoglobin as a nitrite reductase that produces NO under allosteric control. *J Clin Invest*, **115**: 2099–2107.

Hunter CJ, Dejam A, Blood AB, Shields H, Kim-Shapiro DB, Machado RF, Tarekegn S, Mulla N, Hopper AO, Schechter AN, Power GG, Gladwin MT (2004). Inhaled nebulized nitrite is a hypoxia-sensitive NO-dependent selective pulmonary vasodilator. *Nat Med*, **10**: 1122-1127.

Icardo JM, Imbrogno S, Gattuso A, Colvee E, Tota B (2005). The heart of *Sparus auratus*: a reappraisal of cardiac functional morphology in teleosts. *J Exp Zoolol A Comp Exp Biol*, **303**: 665–675.

Ignarro LJ and Gruetter CA (1980). Requirement of thiols for activation of coronary arterial guanylate cyclase by glyceryl trinitrate and sodium nitrite: possible involvement of S-nitrosothiols. *Biochim Biophys Acta*, **631**: 221-31.

Ignarro LJ, Lipton H, Edwards JC, Baricos WH, Hyman AL, Gruetter CA (1981). Mechanism of vascular muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates. *J Pharmacol Exp Ther*, **18**: 739–749.

Imbrogno S, De Iuri L, Mazza R, Tota B (2001). Nitric oxide modulates cardiac performance in the heart of *Anguilla anguilla*. *J Exp Biol*, **204**: 1719-1727.

Imbrogno S, Tota B, Gattuso A (2011). The evolutionary functions of cardiac NOS/NO in vertebrates tracked by fish and amphibian paradigms. *Nitric Oxide*, **25**: 1–10.

Irvine JC, Ritchie RH, Favaloro JL, Andrews KL, Widdop RE, Kemp-Harper BK (2008). Nitroxyl (HNO): the Cinderella of the nitric oxide story. *Trends Pharmacol Sci*, **29**: 601–608.

Jaffrey SR, Erdjument-Bromage H, Ferris CD, Tempst P, Snyder SH (2001). Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide. *Nat Cell Biol*, **3**: 193-197.

Jaffrey SR and Snyder SH (2001). The biotin switch method for the detection of S-nitrosylated proteins. *Sci STKE*, **2001(86)**: PL1.

Jansson EA, Huang L, Malkey R, Govoni M, Nihlén C, Olsson A, Stensdotter M, Petersson J, Holm Weitzberg E, Lundberg JO (2008). A mammalian functional nitrate reductase that regulates nitrite and nitric oxide homeostasis. *Chem Biol*, **4**: 411-417.

Jennings RB, Reimer KA (1991). The cell biology of acute myocardial ischemia. *Annu Rev Med*, **42**: 225-246.

Jones SP and Bolli R (2006). The ubiquitous role of nitric oxide in cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol*, **40**: 16-23.

Jung KH, Chu K, Ko SY, Lee ST, Sinn DI, Park DK, Kim JM, Song EC, Kim M, Roh JK (2006). Early intravenous infusion of sodium nitrite protects brain against in vivo ischemia-reperfusion injury. *Stroke*, **37**: 2744–2750.

Kayyali US, Donaldson C, Huang H, Abdelnour R, Hassoun PM (2001) Phosphorylation of xanthine dehydrogenase/oxidase in hypoxia. *J Biol Chem*, **276**: 14359-14365.

Kim-Shapiro DB, Alan N, Schechter and MT Gladwin (2006). Unraveling the Reactions of Nitric Oxide, Nitrite, and Hemoglobin in Physiology and Therapeutics Arterioscler Thromb *Vasc Biol*, **26**: 697-705.

Komamura K, Shannon RP, Ihara T, Shen YT, Mirsky I, Bishop SP, Vatner SF. (1993). Exhaustion of Frank-Starling mechanism in conscious dogs with heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **265**: H1119–H1131.

Kimura H, Mittal C.K, Murad F (1975). Increases in cyclic GMP levels in brain and liver with sodium azide an activator of guanilate cyclise. *Nature*, **257**: 700-702.

Kleinbongard P, Dejam A, Lauer T, Rassaf T, Schindler A, Picker O, Scheeren T, Gödecke A, Schrader J, Schulz R, Heusch G, Schaub GA, Bryan NS, Feelisch M, Kelm M (2003). Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals. *Free Radic Biol Med*, **35(7)**: 790–796.

Kooy NW, Lewis S J, Royall JA, Ye YZ, Kelly DR, and Beckman JS (1997). Extensive tyrosine nitration in human myocardial inflammation: evidence for the presence of peroxynitrite. *Crit Care Med*, **25**: 812–819.

Korge P, Honda HM, Weiss JN (2002). Protection of cardiac mitochondria by diazoxide and protein kinase C: implications for ischemic preconditioning. *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**: 3312-3317.

Kozlov AV, Staniek K, Nohl H (1999). Nitrite reductase activity is a novel function of mammalian mitochondria. *FEBS Lett*, **454**: 127-130.

Kross BC, Hallberg GR, Bruner DR, Cherryholmes K, Johnson JK (1993). The nitrate concentration of private well water in Iowa. *Am J Public Health*, **83(2)**: 270–272.

Kumar D, Branch BG, Pattillo CB, Hood J, Thoma S, Simpson S, Illum S, Arora N, Chidlow JH Jr, Langston W, Teng X, Lefer DJ, Patel RP, Kevil CG. (2008). Chronic sodium nitrite therapy augments ischemia-induced angiogenesis and arteriogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, **105**: 7540-7545.

Lakatta EG and Jewell BR (1977). Length-dependent activation: its effect on the length-tension relation in cat ventricular muscle. *Circ Res*, **40**: 251-257.

Laskowski A, Woodman OL, Cao AH, Drummond GR, Marshall T, Kaye DM, Ritchie RH (2006). Antioxidant actions contribute to the antihypertrophic effects of atrial natriuretic peptide in neonatal rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*, **72**: 112–123.

Layland J, Li JM, Shah AM (2002). Role of cyclic GMP-dependent protein kinase in the contractile response to exogenous nitric oxide in rat cardiac myocytes. *J Physiol*, **540**: 457–467.

Lancaster JR (1994). Simulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric-oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**: 8137–8141.

Lauer T, Preik M, Rassaf T, Strauer B, Deussen A, Feelisch M, Kelm M (2001). Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action. *Proc Natl Acad Sci USA*, **98**: 12814–12819.

Legssyer AK, Hove-Madsen L, Hoerter J, Fischmeister R (1997). Sympathetic modulation of the effect of nifedipine on myocardial contraction and Ca²⁺ current in the rat. *J Mol Cell Cardiol*, **29**: 579-591.

Lei S. Z., Pan Z. H., Aggarwal S. K., Chen H. S. V., Hartman J., Sucher N. J. et al. (1992). Effect of nitric oxide production on the redox modulatory site of the NMDA receptor-channel complex. *Neuron*, **8**: 1087–1099.

Li H, Cui H, Liu X, Zweier JL (2005). Xanthine oxidase catalyzes anaerobic transformation of organic nitrates to nitric oxide and nitrosothiols: characterization of this mechanism and the link between organic nitrate and guanylyl cyclase activation. *J Biol Chem*, **280**: 16594-16600.

Lillywhite HB, Zippel KC, Farrell AP (1999). Resting and maximal heart rates in ectothermic vertebrates. *Comp Biochem Physiol*, **124A**: 369-382.

- Liu Z, Rudd MA, Freedman JE, Loscalzo J (1998).** S-Transnitrosation reactions are involved in the metabolic fate and biological actions of nitric oxide. *J Pharmacol Exp Ther*, **284**: 526–534.
- Lopatin AN, Nichols CG (2001).** Inward rectifiers in the heart: an update on IK1. *J Mol*, **33(4)**: 625-38.
- Lundberg and Weitzberg (2009).** NO Generation from Inorganic Nitrate and Nitrite: Role in Physiology, Nutrition and Therapeutics. *Arch Pharm Res*, **8**: 1119-1126.
- Lundberg J, Weitzberg E, Gladwin M (2008).** The nitrate–nitrite–nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nature Rev Drug Discovery*, **7**: 156–67.
- Lundberg JO, Weitzberg E, Lundberg JM, Alving K (1994).** Intra-gastric nitric oxide production in humans: measurements in expelled air. *Gut* **35 (11)**: 1543–1546.
- Lundberg JO, Govoni M (2004).** Inorganic nitrate is a possible source for systemic generation of nitric oxide. *Free Radic Biol Med*, **37(3)**: 395–400.
- Maher AR, Milsom AB, Gunaruwan P, Abozguia K, Ahmed I, Weaver RA, Thomas P, Ashrafian H, Born GV, James PE, Frenneaux MP (2008).** Hypoxic modulation of exogenous nitrite-induced vasodilation in humans. *Circulation*, **117**: 670–677.
- Marsh N and Marsh A (2000).** A short history of nitroglycerine and nitric oxide in pharmacology and physiology, *Clin Exp Pharmacol Physiol*, **274**: 313-319.
- Martinez-Ruiz A and Lamas S (2004).** Detection and proteomic identification of S-nitrosylated proteins in endothelial cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **423**: 192–199.
- Massion PB, Pelat M, Belge C, Balligand JL (2005).** Regulation of the mammalian heart function by nitric oxide. *Comp Biochem Physiol*, **142A**: 144–150.

- Mayer B, Pfeiffer S, Schrammel A, Koesling D, Schmidt K, Brunner F (1998).** A new pathway of nitric oxide/cyclic GMP signaling involving S-nitrosoglutathione. *J Biol Chem*, **273**: 3264–3270.
- Meah MN, Harrison N, Davies A, (1994).** Nitrate and nitrite in foods and the diet. *Food Addit. Contam*, **11(4)**: 519–532.
- Meredith CG, Maldonado AL, Speeg KV Jr (1985).** The effect of ketoconazole on hepatic oxidative drug metabolism in the rat in vivo and in vitro. *Drug Metab Dispos*, **13**: 156–162.
- Millar TM, Stevens CR, Benjamin N, Eisenthal R, Harrison R, Blake DR (1998).** Xanthine oxidoreductase catalyses the reduction of nitrates and nitrite to nitric oxide under hypoxic conditions. *FEBS Lett*, **427**: 225-228.
- Miyagawa K, Ohashi M, Yamashita S, Kojima M, Sato K, Ueda R, Dohi Y (2007).** Increased oxidative stress impairs endothelial modulation of contractions in arteries from spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*, **25**: 415-421.
- Modin A, Bjorne H, Herulf M, Alving K, Weitzberg E, Lundberg JO (2001).** Nitrite-derived nitric oxide: a possible mediator of ‘acidic-metabolic’ vasodilation. *Acta Physiol Scand*, **171**: 9-16.
- Moriel P and Abdalla DS (1997).** Nitrotyrosine bound to beta-VLDL-apoproteins: a biomarker of peroxynitrite formation in experimental atherosclerosis. *Biochem Biophys Res Commun*, **232**: 332–335.
- Morita H, Wu J, Zipes DP (2008).** The QT syndromes: long and short. *Lancet*, **372**: 750–763.
- Murad F, Waldman S, Molina C, Bennett B, Leitman D (1987).** Regulation and role of guanylate cyclase-cyclic GMP in vascular relaxation. *Prog Clin Biol Res*, **249**: 65-76.

Myers PR, Minor RL Jr, Guerra R Jr, Bates JN, Harrison DG (1990). Vasorelaxant properties of the endothelium-derived relaxing factor more closely resemble S-nitrosocysteine than nitric oxide. *Nature*, **345**: 161-163.

Nadtochiy SM, Burwell LS, Brookes PS (2007). Cardioprotection and mitochondrial S-nitrosation: effects of S-nitroso-2-mercaptopyrionyl glycine (SNO-MPG) in cardiac ischemia-reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol*, **42**: 812–825.

Nagababu E, Ramasamy S, Abernethy DR, Rifkind JM (2003). Active nitric oxide produced in the red cell under hypoxic conditions by deoxyhemoglobin-mediated nitrite reduction. *J Biol Chem*, **278**: 46349-46356.

Nichols CG and Lopatin AN (1997). Inward rectifier potassium channels. *Annu Rev Physiol*, **59**: 171-191.

Noujaim SF, Pandit SV, Berenfeld O, Vikstrom K, Cerrone M, Mironov S, Zugermayr M, Lopatin AN, Jalife J (2007). Up-regulation of the inward rectifier K⁺ current (IK1) in the mouse heart accelerates and stabilizes rotors. *J Physiol*, **578**: 315–326.

Pagliari P, Chiribiri A, Gattullo D, Penna C, Rastaldo R, Recchia FA (2002). Fatty acids are important for the Frank-Starling mechanism and Gregg effect but not for catecholamine response in isolated rat hearts. *Acta Physiol Scand*, **176**: 167–176.

Palmer RM, Ashton DS, Moncada S (1988). Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*, **333 (6174)**: 664–666.

Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, **327**: 524-526.

Parmley WW and Chuck L (1973). Length-dependent changes in myocardial contractile state. *Am J Physiol*, **224**: 1195-1199.

Paolocci N, Jackson MI, Lopez BE, Miranda K, Tocchetti CG, Wink DA, Hobbs AJ, Fukuto JM (2007). The pharmacology of nitroxyl (HNO) and its therapeutic potential: not just the Janus face of NO. *Pharmacol Ther*, **113**: 442-458.

Paolocci N, Katori T, Champion HC, St John ME, Miranda KM, Fukuto JM, Wink DA, Kass DA (2003). Positive inotropic and lusitropic effects of HNO/NO- in failing hearts: independence from beta-adrenergic signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*, **100**: 5537-5542.

Parthasarathy DK and Bryan NS(2012). Sodium nitrite: the "cure" for nitric oxide insufficiency. *Meat Sci*, **92(3)**: 274-279.

Pawloski JR, Swaminathan RV, Stamler JS (1998). Cell-free and erythrocytic S-nitrosohemoglobin inhibits human platelet aggregation. *Circulation*, **97**: 263-267.

Pellegrino D, Palmerini CA, Tota B (2004). No hemoglobin but NO: the icefish (*Chionodraco hamatus*) heart as a paradigm. *J Exp Biol*, **207**: 3855-3864.

Pellegrino D, Shiva S, Angelone T, Gladwin MT, Tota B (2009). Nitrite exerts potent negative inotropy in the isolated heart via eNOS-independent nitric oxide generation and cGMP-PKG pathway activation. *Biochim Biophys Acta*, **1787**: 818-827.

Petroff MG, Kim SH, Pepe S, Dessy C, Marban E, Balligand JL, Sollott SJ. (2001). Endogenous nitric oxide mechanisms mediate the stretch dependence of Ca²⁺ release in cardiomyocytes. *Nat Cell Biol*; **3**: 867-873.

Pinsky, DJ, Patton S, Mesaros S, Brovkovich V, Kubaszewski E, Grunfeld S, Malinski T (1997): Mechanical transduction of nitric oxide synthesis in the beating heart. *Circ Res*, **81**: 372-379.

Piuhola J, Szokodi I, Kinnunen P, Ilves M, deChâtel R, Vuolteenaho O, Ruskoaho H. (2003). Endothelin-1 contributes to the Frank-Starling response in hypertrophic rat hearts. *Hypertension*, **41**: 93-8.

Prendergast BD, Sagach VF, Shah AM (1997). Basal release of nitric oxide augments the Frank-Starling response in the isolated heart. *Circulation*, **96**: 1320–1329.

Pryor WA and Lightsey JW (1981). Mechanisms of nitrogen dioxide reactions: initiation of lipid peroxidation and the production of nitrous acid. *Science*, **214**: 435–437.

Pryor WA, Church DF, Govindan CK, Crank G (1982). Oxidation of thiols by nitric oxide and nitrogen dioxide: synthetic utility and toxicological implications. *J Organic Chem.* **47**: 156–159.

Rassaf T, Bryan NS, Kelm M, Feelisch M (2002). Concomitant presence of N-nitroso and S-nitroso proteins in human plasma. *Free Radic Biol Med*, **33**: 1590-1596.

Rassaf T, Flögel U, Drexhage C, Hendgen-Cotta U, Kelm M, Schrader J (2007). Nitrite reductase function of deoxymyoglobin: oxygen sensor and regulator of cardiac energetic and function. *Circ Res*, **100**: 1749-1754.

Reutov VP (1995). Nitric Oxide Cycle in Mammalian Body. *Usp Biol Khim*, **35**: 189-228.

Reutov VP, Sorokina EG (1998). NO-synthase and nitrite-reductase components of nitric oxide cycle. *Biochemistry (Mosc)*, **63**: 874-84.

Reutov VP, Sorokina EG, Kaiushin LP (1994). The nitric oxide cycle in mammals and nitrite reducing activity of heme-containing proteins. *Vopr Med Khim*, **40**: 31-5.

Rodriguez J, Maloney RE, Rassaf T, Bryan NS, Feelisch M (2003). Chemical nature of nitric oxide storage forms in rat vascular tissue. *Proc Natl Acad Sci USA*, **100**: 336–341.

Schulz R, Rassaf T, Massion PB, Kelm M, Balligand JL (2005). Recent advances in the understanding of the role of nitric oxide in cardiovascular homeostasis. *Pharmacol Ther*, **108**: 225–256.

Seddon M, Shah AM, Casadei B. (2007). Cardiomyocytes as effectors of nitric oxide signalling. *Cardiovasc Res*, **75**: 315–326.

Seth D and Stamler JS (2011). The SNO-proteome: causation and classifications. *Curr Opin Chem Biol*, **15**: 129-36.

Sheets JJ and Mason JI (1984). Ketoconazole: a potent inhibitor of cytochrome P-450-dependent drug metabolism in rat liver. *Drug Metab Dispos*, **12**: 603–606.

Shi Q, Feng JH, Qu HB, Cheng YY (2008). A Proteomic Study of S-Nitrosylation in the Rat Cardiac Proteins in Vitro. *Biol Pharm Bull*, **31(8)**: 1536-1540.

Shiels HA and White E (2008). The Frank–Starling mechanism in vertebrate cardiac myocytes. *J Exp Biol*, **211**: 2005–2013.

Shiva S, Huang S, Grubina R, Ringwood LA, MacArthur P, Xu X, Darley-USmar VM, Gladwin MT (2007). Deoxymyoglobin is a nitrite reductase that generates nitric oxide and regulates mitochondrial respiration. *Circ Res*, **492**: 654-661.

Shiva S, Sack MN, Greer JJ, Duranski M, Ringwood LA, Burwell L, Wang X, MacArthur PH, Shoja A, Raghavachari N, Calvert JW, Brookes PS, Lefer DJ, Gladwin MT (2007). Nitrite augments tolerance to ischemia/reperfusion injury via the modulation of mitochondrial electron transfer. *J Exp Med*, **204**: 2089-102.

Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J (1992). Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science*, **258**: 1898-1902.

Stamler JS, Jia L, Eu JP, McMahon TJ, Demchenko IT, Bonaventura J, Gernert K, Piantadosi CA. (1997). Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient. *Science*, **276**: 2034–2037.

Stefanon I, Vassallo DV, Mill JG (1990). Left ventricular length dependent activation in the isovolumetric rat heart. *Cardiovasc Res*, **24**: 254–256.

Sun J, Morgan M, Shen RF, Steenbergen C, Murphy E (2007). Preconditioning results in S-nitrosylation of proteins involved in regulation of mitochondrial energetic and calcium transport. *Circ Res*, **101**: 1155–63.

Sun J and Murphy E (2010). Protein S-nitrosylation and cardioprotection. *Circ Res*, **106**: 285–96.

Sun J, Picht E, Ginsburg KS, Bers DM, Steenbergen C, Murphy E. (2006). Hypercontractile female hearts exhibit increased S-nitrosylation of the L-type Ca²⁺ channel $\alpha 1$ subunit and reduced ischemiareperfusion injury. *Circ Res*, **98**: 403–411.

Sun J, Xu L, Eu JP, Stamler JS, Meissner G. Nitric oxide (2003). NOC-12, and S-nitrosoglutathione modulate the skeletal muscle calcium release channel/ryanodine receptor by different mechanisms: an allosteric function for O₂ in S-nitrosylation of the channel. *J Biol Chem*, **278**: 8184–8189.

Sutherland FJ and Hearse DJ (2000). The Isolated blood and perfusion fluid perfused heart. *Pharmacol Res*, **41**: 613-627

Szabo C, Salzman AL, Ischiropoulos H (1995). Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123 occurs in early stages of endotoxic and hemorrhagic shock and ischemia-reperfusion injury. *FEBS Lett*, **372**: 229–232.

Tota B and Gattuso A (1996). Heart ventricle pumps in teleosts and elasmobranchs: a morphodynamic approach. *J Exp Zool*, **275**: 162–171.

Tota B, Quintieri AM, Angelone T (2010). The emerging role of nitrite as an endogenous modulator and therapeutic agent of cardiovascular function. *Curr Med Chem*, **17(18)**: 1915-1925.

Tota B, Acierno R, Agnisola C (1991). Mechanical performance of the isolated and perfused heart of the haemoglobinless Antarctic icefish *Chionodraco hamatus* (Lonnberg): effects of loading conditions and temperature. *Phil Trans R Soc Lond B*, **332**: 191–198.

Tucci PJF, Bregagnollo EA, Spadaro J, Cicogna AC, Ribiero MCL (1984). Length-dependence of activation studied in the isovolumic blood-perfused dog heart. *Circ Res*, **55**: 59–66.

Vallance P (1997). Dietary nitrate: poison or panacea? *Gut* **40 (2)**: 211–214.

Van Maanen JM, Van Geel AA, Kleinjans JC (1996). Modulation of nitrate-nitrite conversion in the oral cavity. *Cancer Detect Prev*, **20 (6)**: 590–596.

Whalen EJ, Foster MW, Matsumoto A, Ozawa K, Violin JD, Que LG, Nelson CD, Benhar M, Keys JR, Rockman HA, Koch WJ, Daaka Y, Lefkowitz RJ, Stamler JS. (2007). Regulation of beta-adrenergic receptor signaling by S-nitrosylation of G-protein coupled receptor kinase 2. *Cell*, **129**: 511-522.

Walker R (1996). The metabolism of dietary nitrites and nitrates. *Biochem Soc Trans*, **24 (3)**: 780–785.

Wang P. and Zweier JL (1996). Measurement of nitric oxide and peroxynitrite generation in the postischemic heart. Evidence for peroxynitrite-mediated reperfusion injury. *J Biol Chem*, **271**: 29223–29230.

Wang Z, Yue L, White M, Pelletier G, Nattel S (1998). Differential distribution of inward rectifier potassium channel transcripts in human atrium versus ventricle. *Circulation*, **98**: 2422–2428.

Webb A, Bond R, McLean P, Uppal R, Benjamin N, Ahluwalia A (2004). Reduction of nitrite to nitric oxide during ischemia protects against myocardial ischemia-reperfusion damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**: 13683-13688.

Wennmalm A, Benthin G, Petersson AS (1992). Dependence of the metabolism of nitric oxide (NO) in healthy human whole blood on the oxygenation of its red cell haemoglobin. *Br J Pharmacol*, **106**: 507-508.

Wennmalm A, Benthin G, Edlund A, Jungersten L, Kieler-Jensen N, Lundin S, Westfelt UN, Petersson AS, Waagstein F (1993). Metabolism and excretion of nitric oxide in humans: an experimental study. *Circ Res*, **73**: 1121-1127.

Williams JC, Armesilla AL, Mohamed TM, Hagarty CL, McIntyre FH, Schomburg S, Zaki AO, Oceandy D, Cartwright EJ, Buch MH, Emerson M, Neyses L (2006). The sarcolemmal calcium pump, alpha-1 syntrophin, and neuronal nitric-oxide synthase are parts of a macromolecular protein complex. *J Biol Chem*, **281(33)**: 23341-23348.

Wink DA, Miranda KM, Katori T, Mancardi D, Thomas DD, Ridnour L, Espey MG, Feelisch M, Colton CA, Fukuto JM, Pagliaro P, Kass DA, Paolocci N (2003). Orthogonal properties of the redox siblings nitroxyl and nitric oxide in the cardiovascular system: a novel redox paradigm. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **285**: H2264-H2276.

Xu KY, Huso DL, Dawson TM, Bredt DS, Becker LC (1999). Nitric oxide synthase in cardiac sarcoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**: 657-662.

Xu L, Eu JP, Meissner G, Stamler JS (1998). Activation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation. *Science*, **279**: 234-237.

Zhang GX, Kimura S, Nishiyama A, Shokoji T, Rahman M, Yao L, Nagai Y, Fujisawa Y, Miyatake A, Abe Y (2005). Cardiac oxidative stress in acute and chronic isoproterenol-infused rats. *Cardiovasc Res*, **65**: 230-238.

Zhang YH, Zhang MH, Sears CE, Emanuel K, Redwood C, El-Armouche A, Kranias EG, Casadei B (2008). Reduced phospholamban phosphorylation is associated with impaired relaxation in left ventricular myocytes from neuronal NO synthase deficient mice. *Circ Res*, **102**: 242–249.

Zweier JL, Wang P, Samouilov A, Kuppusamy P (1995). Enzyme-independent formation of nitric oxide in biological tissues. *Nat Med*, **1(8)**: 804–809.

Zweier JL, Broderick R, Kuppusamy P, Thompson-Gorman S, Luty GA (1994). Determination of the mechanism of free radical generation in human aortic endothelial cells exposed to anoxia and reoxygenation. *J Biol Chem*, **269**: 24156-24162.

Zweier JL, Li H, Samouilov A, Liu X (2010). Mechanisms of nitrite reduction to nitric oxide in the heart and vessel wall. *Nitric Oxide*, **22**: 83–90.