



Kan Akımının Yerel Olarak Düzenlenmesinde Eritrositlerin Rolü

Role of Erythrocytes on Local Blood Flow Regulation

Pınar ÜLKER, Filiz BASRALI

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fiziyojji Anabilim Dalı, Antalya, Türkiye

Yazışma Adresi
Correspondence Address

Pınar ÜLKER
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fiziyojji Anabilim Dalı
Antalya, Türkiye
E-posta: pkaradamar@yahoo.com
ORCID ID: 0000-0003-1772-5641

Geliş tarihi \ Received : 28.08.2015
Kabul tarihi \ Accepted : 14.08.2017
Elektronik yayın tarihi : 25.09.2018
Online published

Ülker P, Basralı F. Kan akımının yerel olarak düzenlenmesinde eritrositlerin rolü. Akd Tıp D 2018;3:208-14.

ÖZ

Amaç: Eritrositler basit yapılarından dolayı son yıllara kadar, fonksiyonları solunum gazlarının taşınmasıyla çevrelenmiş hücreler olarak değerlendirilmiştir. Oysa günümüzde, eritrositlerin bir çok hücre içi sinyal yolağına sahip olduğu ve dolaşım sisteminde hücrelerin karşılaştıkları mekanik kuvvetlerin etkisinde bu yolakların bir kısmının aktive olduğu bilinmektedir. Aktive olan bu yolaklar sonucu açığa çıkan bazı vazoaaktif ürünlerin ise dolaşımın yerel düzenlenmesinde rolü olabileceği gösterilmiştir.

Gereç ve Yöntemler: Derleme makalemizde eritrositlerden farklı koşullarda salgılanan vazoaaktif ajanların yerel kan akımını düzenlenmesinde rol aldığı gösteren çalışmalarımızın ayrıntıları yer almaktadır.

Bulgular: Çalışmalarımızın sonuçları, eritrosit nitrik oksit sentaz (NOS) enziminin hücrelerin maruz kaldığı mekanik kuvvetlerin etkisiyle aktifleştiğini, hücrelerde nitrik oksit (NO) üretiminin arttığını ve bu NO'nun hücre dışına çıkarak damar düz kasında anlamlı bir gevşeme yanıtına neden olduğu ilk kez gösterilmiştir.

Sonuç: Eritrositler vazoaaktif ajanlar salgılayarak dolaşımın yerel düzenlenmesinde rol almaktadır.

Anahtar Sözcükler: Eritrosit, Yerel kan akımı, NOS

ABSTRACT

Objective: Erythrocytes are known as carriers of respiratory gasses, due to their simple structure. However, it is well known that erythrocytes have many intracellular signalling mechanisms that can be activated in response to mechanical forces. The vasoactive substances released from red blood cells as a result of these activated mechanisms have been shown to be effective in the regulation of local circulation.

Material and Methods: In this review article, we present a summary of our research results demonstrating the effects of vasoactive substances released from erythrocytes under different conditions.

Results: The results of our studies demonstrated for the first time that erythrocyte nitric oxide synthase (NOS) enzyme is activated by mechanical forces and nitric oxide (NO) production is increased in erythrocytes. This NO then diffuses to smooth muscle cells where it causes relaxation.

Conclusion: Erythrocytes play a role in local blood flow regulation by releasing vasoactive substances.

Key Words: Erythrocyte, Local blood flow, Set back, NOS

GİRİŞ

Eritrositler yüksek miktardaki hemoglobin içerikleri nedeniyle genel olarak solunum yüzeyleri ile metabolik olarak aktif dokular arasında oksijen (O_2) taşınmasını sağlayan hücreler olarak tanımlanırlar. Ancak son yıllarda eritrositlerin kan akımının yerel olarak düzenlenmesinde de rol aldığı gösterilmiştir (1-4). Dokulara oksijen sunumunun gerçekleşmesi kan akımıyla ilişkili olduğundan eritrositler tarafından kan akımının düzenlenebiliyor olması fizyolojik açıdan büyük önem taşımaktadır.

Eritrositler hem endotel aracılı hem de endotelden bağımsız mekanizmalarla damar düz kasında gevşemeye ve böylece kan akımında artışa neden olmaktadır. Bu mekanizmalar eritrositlerden salınan moleküllere göre 2 ana başlıkta toplanabilir (5-8). Bunlar; 1) Eritrositlerden adenozin trifosfat (ATP) salınımı 2) Eritrositlerden nitrik oksit (NO) ya da NO-biyoaktivitesine sahip moleküllerin salınımıdır.

1) Eritrositlerden ATP Salınımı

Eritrositler, hücre membranında yerleşmiş glikolitik enzimler tarafından üretilen milimolar düzeylerde ATP içerir (9). Eritrositlerden ATP salınımı tarihsel olarak eritrositlerin kan akımı düzenlenmesinde tanımlanan ilk rolleridir ve ilk defa 1992 yılında Forrester ve ark.'nın insan eritrositleri ile yaptıkları bir çalışma ile gösterilmiştir (1, 8, 10). Eritrositlerden plazmaya salınan ATP endotel hücreleri üzerinde bulunan reseptörlerine bağlanarak etkisini gösterir. ATP'nin endotel hücrelerinde bulunan hedef reseptörleri purinerjik P2y reseptörlerdir. Bu reseptörler Gq proteini ile eşleşen G protein bağlı reseptörler olup aktive olunca hücrede fosfolipaz C (PLC) aktivasyonu üzerinden inositol 3 fosfat (IP_3) yapımını artırurlar. Böylelikle endotel hücrelerinde nitrik oksit (NO) sentezi başlar ve sentezlenen NO, düz kas hücrelerine difüze olarak burada guanilat siklaz (GC) aktivasyonu ile gevşeme yanıtına ve kan akımında artışa neden olur (11).

Günümüzde çeşitli fizyolojik ve farmakolojik uyanlara cevaben eritrositlerden kontrollü bir şekilde ATP salınımının gerçekleştiği bilinmektedir. Eritrositlerden ATP salınımını sağlayan fizyolojik uyanlar arasında eritrositlerin mikrodolaşımdan geçerken karşılaştıkları mekanik kuvvetler (12-14) ve düşük oksijen parsiyel basınçları (10, 15, 16) yer almaktadır. Her iki durumda da hücreden salınan ATP miktarı uyanın büyüklüğünden etkilenmektedir. Hücreden ATP çıkışına neden olan farmakolojik uyanlar arasında ise eritrosit membranında bulunan beta adrenerjik reseptörleri aktive eden ajanlar yer almaktadır. Bunlar da doza bağımlı olarak ATP salınımını düzenlerler (17).

2) Eritrositlerden NO ve NO Biyoaktivitesine Sahip Moleküllerin Salınımı

Eritrosit ve NO ilişkisini araştıran ilk çalışmalar eritrositlerde bulunan hemoglobinin 'NO tüketici' etkisi üzerinde durmuştur (6, 18, 19). Bu nedenle eritrositlerin damar düz kas tonüsünün belirlenmesindeki tek temel fonksiyonlarının plazma içindeki NO seviyelerinin azaltılması yönünde olduğu düşünülmüştür. Eritrositlerin NO tüketici etkileri kan akımıyla ve hemoglobinin lokalizasyonu ile yakından ilişkilidir. Kan akımında meydana gelen artış NO tüketici etkiyi azaltırken (20), hemoglobinin plazmada serbest halde olması bu etkiyi 600 kat arttırmaktadır (6). Ayrıca parsiyel oksijen basıncı da hemoglobinin NO'ya afinitesini etkilemektedir. Yüksek oksijen parsiyel basınçlarında hemoglobinin NO'ya afinitesi artarken, parsiyel oksijen basıncının düşmesiyle bu afinite azalmaktadır (21, 22).

Bütün bunların yanında son yıllarda yapılan çalışmalar eritrositlerin NO biyoaktivitesindeki rollerinin sadece NO tüketimi değil; bunun yanında plazmaya NO salınımını gerçekleştirmek de olduğunu göstermiştir. Bugün eritrositler tarafından plazmaya NO salınımına ilişkin 3 farklı mekanizmadan bahsetmek mümkündür:

- Eritrositler endotel hücreleri tarafından üretilen NO'yu hemoglobine bağlı olarak S-nitrosohemoglobin halinde taşıyıp hipoksik koşullarda plazmaya salırlar (3)
- Eritrositler plazmada bulunan nitriti hipoksik koşullarda NO'ya çevirirler (2, 23)
- Eritrositler eNOS enziminin aktivasyonu ile NO üretirler (4, 24, 25)

A) NO'nun S-nitrosotiol Şeklinde Taşınması

S-nitrosohemoglobinin de içinde yer aldığı S-nitrosotioller (SNO), bir tiolün sülfür atomuna kovalent olarak bağlanmış nitrosil grubu içeren yapılardır. Genel formülleri RSNO dur. RSNO'lar, sistein ya da glutatyon gibi düşük moleküler ağırlıklı moleküllerden Hb gibi yüksek moleküler ağırlıklı proteinlere kadar değişen farklı organik yapılardan oluşabilir (26). NO ve hemoglobinin S-nitrosotioller şeklinde birlikte bulunabileceği ilk olarak 1992 yıllarında literatürde yerini almıştır (3, 27). Hemoglobin tarafından inaktive edilmeye karşı oldukça dirençli olan bu yapının NO'ya göre daha uzun bir biyolojik aktivite süresi olduğu da bilinmektedir (28).

Bu konuda yapılan araştırmalar eritrositlerin akciğerlerde oksijen ile yüklenmeleri sırasında endotel hücreleri tarafından sentezlenen NO'nun eritrosit içine girdiğini ve oksijen ile yüklü R konumundaki hemoglobinin beta zincirine bağlanarak SNO oluşturduğunu göstermiştir. SNO eritrositler içinde damar sisteminin diğer bölümlerine taşınmakta ve hipoksik koşullarda hemoglobinin desatürasyonu sırasında oksijen ile birlikte ortama salınmaktadır (2;

64). Dolayısıyla eritrositler birer NO taşıyıcısı olarak NO biyoaktivitesine katılmaktadır. Eritrositler tarafından SNO şeklinde taşınan ve hipoksik koşullarda lümene salınan NO ise damar düz kasında siklik guanozin monofosfat (cGMP) aracılı vazodilatasyon yanıtının gelişmesine neden olmaktadır(7, 21, 29).

B) Nitritin İndirgenmesi

Nitrit, NO'nun biyolojik bir metabolitidir ve nitrat ile birlikte deneysel çalışmalarda yerel ve sistemik dolaşımdaki NO seviyesinin bir göstergesi olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bunun yanında nitritin, asidotik ve hipoksik koşullarda bir NO prekürsörü olduğu gösterilmiş ve böylece nitrite bakış açısı daha da gelişmiştir (30, 31).

Dolaşım sisteminde bulunan nitritin kaynağı büyük oranda eNOS enzimi tarafından yapıp lümene difüze olan NO'dur (32). eNOS enzimi bulunmayan farelerin plazma nitrit seviyelerinin kontrollerine göre % 70 oranında daha düşük olduğu gösterilmiştir (33, 34). Nitritin fizyolojide giderek artan önemine karşın kanda stabil şekilde bulunmaması ve kan alınırken meydana gelen kontaminasyonlar nedeniyle plazma örneklerinde nitrit konsantrasyonlarının belirlenmesi oldukça güçtür. Bu nedenle bugüne kadar rapor edilen sonuçlarda nitritin plazma konsantrasyonları oldukça geniş aralıklarda tanımlanmıştır (35, 36). Dejam ve ark. dinlenim durumunda tam kandaki nitrit seviyelerini yaklaşık 200 nM; eritrositteki nitrit seviyelerini ise 300nM olarak saptamıştır. Buna göre eritrositler plazmadan daha yüksek miktarda nitrit içermektedir (37).

Eritrositler tarafından nitritin NO'ya indirgenmesi, lümende bulunan nitritin eritrosit içine girmesiyle gerçekleşir. Nitritin eritrositlere girişi hakkındaki ilk görüşler Band 3 proteininin aracılığına işaret etse de bu süreçte başka mekanizmaların da rol alabileceği düşünülmektedir (38, 39). Eritrositler hücre içindeki nitriti deoksihemoglobinin veya membranda bulunan ksantin oksidoreduktaz ve nitrik oksit sentaz enzimleri aracılığıyla NO'ya indirgeyebilmektedir (2, 40). Eritrositler tarafından nitrit indirgenmesi yoluyla oluşturulan NO'nun damar düz kasında gevşemeye neden olduğu gösterilse de (30, 41, 42); böyle bir yanıt elde edebilmek için gereken nitrit konsantrasyonları fizyolojik sınırların üstünde olduğundan fizyolojik koşullarda nitritin vazodilatör rolü tam olarak netlik kazanmamıştır (43, 44).

C) NOS aracılığıyla NO Sentezi

Doku kan akımının düzenlenmesinde önemi rolleri olduğu bilinen NO'nun sentezinden genel olarak sadece endotel hücreleri sorumlu tutulmuştur (45, 46). Ancak deneysel çalışmalar ve teorik analizler, dolaşım sisteminde endotel hücrelerinin dışında başka hücreler tarafından da NO sentezlendiği ve dolaşıma salındığı göstermiştir (47, 48). Sayıları göz önüne alındığında, bu hücreler arasında özellikle eritrositler önemli bir yere sahiptir (24).

Bu konuda yapılan ilk çalışmalar eritrositlerde bir NOS enziminin var olduğunu gösterse de bu çalışmalarda enzimin aktif olduğu kanıtlanamamış ve eritrositlerin gelişim sürecinde fonksiyonunu kaybeden inaktif bir protein olarak tanımlanmıştır (49). İlk olarak 2006 yılında Kleinbongard ve ark. tarafından yapılan kapsamlı bir çalışmada eritrositlerde aktif bir NOS enzimi bulunduğu kanıtlanmıştır (24).

Eritrosit NOS Aktivitesinin Düzenlenmesi

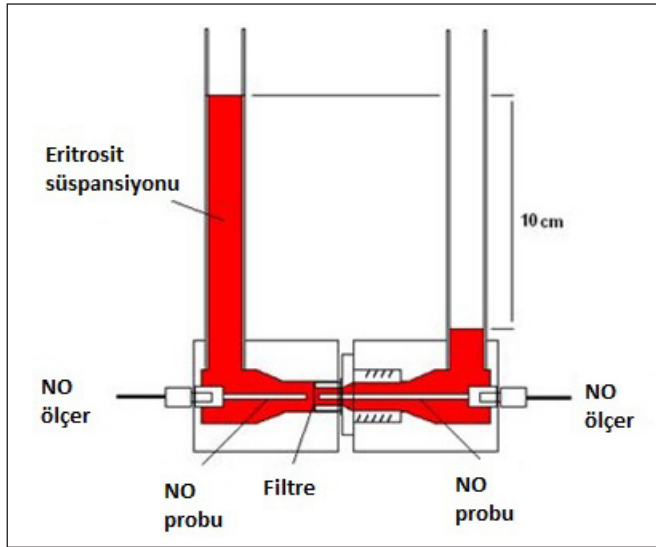
Eritrositlerde bulunan NOS enzimi endotel hücrelerinde bulunan eNOS enzimi gibi L-arjinin tarafından uyarılır ve genel NOS inhibitörlerine duyarlıdır. Enzimin aktivasyonu serin 1177 bölgesinden fosforilasyonu ve hücre içi kalsiyum düzeyleri tarafından belirlenmektedir (24). Bu nedenlerle eritrosit NOS enziminin endotel hücrelerinde bulunan eNOS enzimine benzerliği dikkat çekmektedir. Ayrıca NOS enzim aktivitesi de eritrositlerde ve endotel hücrelerine birbirine yakındır (0.3 -0.7 pmol/pg/dk) (24). Ancak eritrosit kaynaklı NOS, bazı noktalarda da endotel eNOS enzimden ayrılır (24). Eritrositler çekirdek, endoplazmik retikulum ve golgi kompleksi gibi hücre organelleri içermediğinden birçok NOS düzenleme mekanizmasına da sahip değildirlir (50).

Eritrosit NOS enziminin aktivitesi endotel hücrelerinde olduğu gibi enzimin hücre içindeki lokalizasyonuna bağlıdır ve yine endotel hücrelerinde olduğu gibi döngüsel olarak işlemektedir. Bu mekanizmalar henüz teorik olsa da eritrosit NOS enziminin düzenlenme mekanizması şöyle işlemektedir: Eritrosit NOS enzimi sitoplazmada kaveolin-1 proteinine bağlı olarak inaktif halde bulunur ve buradan membrana veziküler tansport yoluyla taşınarak membranda lipitten zengin bölgelere bağlanır. Kayma gerilimi sinyalleri ya da reseptör aracılı uyarım bir yandan enzimin serin 1177 bölgesinden fosforilasyonuna neden olurken bir yandan da hücreye Ca^{+2} girişine neden olur. Hücreye giren Ca^{+2} 'un kalmodulin ile bağlanmasıyla kalmodülün aktif hale geçer ve membranda bulunan NOS enzimine bağlanır. Bu bağlanma NOS enzimi ile kaveolin-1 proteini arasındaki bağı koparıp NOS'un aktifleşerek membrandan sitoplazmaya geçmesine neden olur. Sitoplazmada bulunan stres proteinlerinden Hsp90 proteinleri aktif hale geçen NOS'a bağlanarak enzimin aktivitesini stabilize eder ve böylece NO oluşumunu artırır. Hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonlarında meydana gelen düşüş ile birlikte NOS ile kalmodulin arasındaki bağı zayıflar ve NOS kaveolin-1 proteinine yeniden bağlanır. Böylece enzim tekrar inaktif duruma geçer (51).

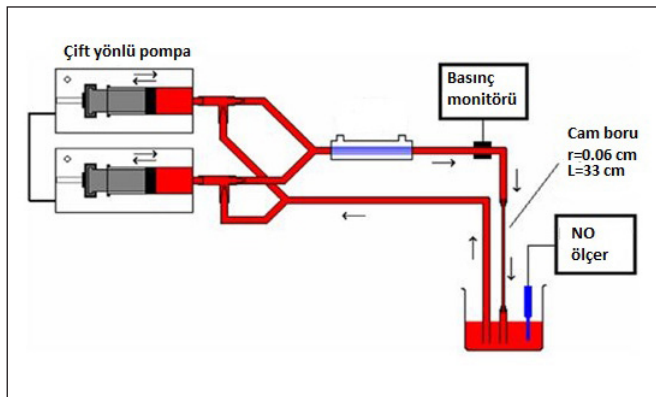
Eritrositlerde aktif bir NOS enziminin bulunmasıyla birlikte bu enzimin aktifleşme mekanizmaları merak uyandırmıştır. Bu konuda yapılan ilk çalışmalar eritrositlere insülin ve asetilkolin uygulamasına cevaben NOS enziminin aktive olduğunu ve hücrelerden NO çıkışının arttığını

göstermiştir (24, 52). Öte yandan endotel hücrelerinde bulunan NOS enziminde olduğu gibi eritrositlerde bulunan NOS enziminin de hücrelere etki eden mekanik kuvvetler tarafından aktiveşebileceği öne sürülmüştür (4, 24).

Eritrositte bulunan NOS enziminin mekanik kuvvetlere cevaben aktivasyonu ile ilgili ilk deneysel çalışma 2007 yılında Fischer ve ark. tarafından yapılmış ve eritrositlerde bulunan NOS enziminin, kardiy pulmoner bypass cerrahisi sırasında hücrelerin ekstrakorporeal dolaşımdan geçerken karşılaştıkları mekanik kuvvetler tarafından aktiveşirildiği gösterilmiştir (53). Bununla birlikte laboratuvarımızda yapılan bir dizi deneysel çalışmada eritrositler mikrodolaşımda ve büyük damarlarda gözlenen mekanik kuvvetleri taklit edecek şekilde birbirinden farklı özellikte ve büyüklükteki mekanik stres uygulamalarına

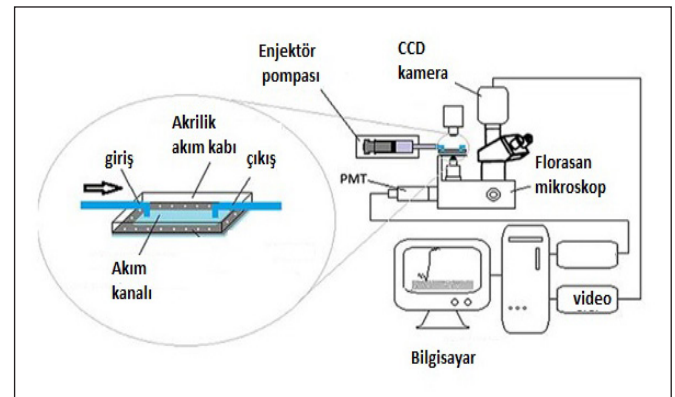


Şekil 1: Eritrositlerin 10 cm H₂O basınç farkı altında 5 µm çapındaki silindirik porlara sahip filtrelerden geçirilerek mekanik kuvvet uygulandığı deney düzeneği (Ulker ve ark.; Biorheology, 2009).

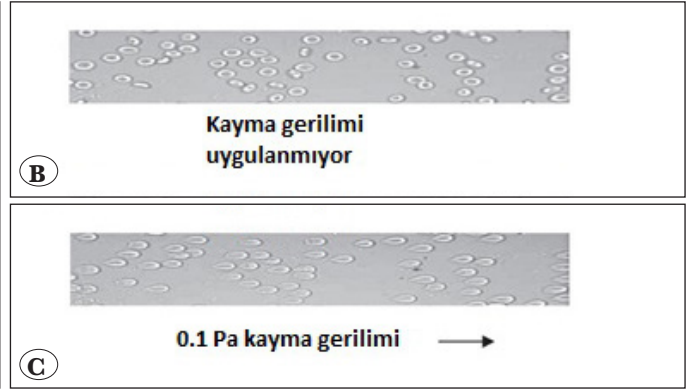
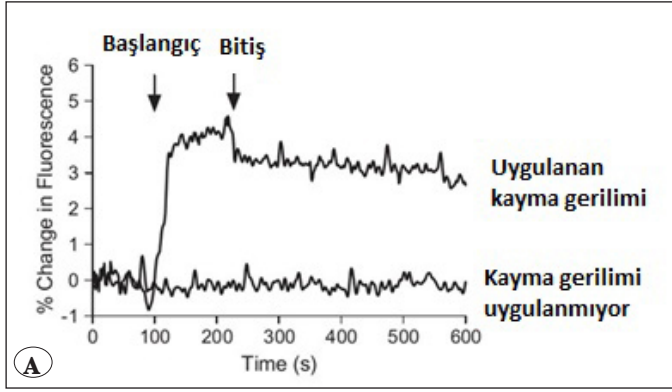


Şekil 2: Eritrositlerin 0.12 cm çapa ve 33 cm boya sahip bir kapiller borudan 30 dakika boyunca pompalanarak hücrelere mekanik kuvvet uygulandığı deney düzeneği (Ulker ve ark.; Bioreheology, 2009).

tabi tutulmuş ve eritrositlerdeki NOS enzim aktivitesi ve eritrositlerden NO çıkışı araştırılmıştır (25, 54, 55). İlk çalışmamızda eritrosit süspansiyonları 10 cm H₂O basınç farkı altında 5 µm çapındaki silindirik porlara sahip filtrelerden geçirilmiştir (Şekil 1) (55). Belirtilen koşullarda mekanik stres uygulaması eritrositlerden NO çıkışının artmasına neden olmuştur. Bu çıkışın non-spesifik NOS inhibitörü olan L-NAME ile inhibe edilmesi ve süspansiyon ortamına kalsiyum eklenmesiyle artırması, NO oluşumunda NOS enzim aktivasyonunun ve hücre içi kalsiyumun önemini vurgulamıştır. İkinci çalışmamızda eritrosit süspansiyonları 0,12 cm çapa ve 33 cm boya sahip bir kapiller borudan 30 dakika boyunca pompalanarak hücrelere 2 Pa düzeyinde kayma gerilimi uygulanmıştır (Şekil 2) (25). Bu şekilde mikrodolaşım koşullarında gözlenen mekanik kuvvet düzeyleri modellenmiştir. Eritrositlerin bu şartlarda kayma kuvvetlerine maruz kalması hücrelerden NO çıkışına neden olmuştur. Bu çalışmalarda hücrelerden mekanik stres uygulamasına cevaben NO çıkışının gerçekleştiği, süspansiyon ortamında NO ve nitrit/nitrat konsantrasyonlarının tayini ile gösterilmiştir. Ayrıca bu çıkışın eNOS enzim aktivasyonuna bağlı olduğu NOS enziminin serin 1177 bölgesinden fosforilasyonundaki artış ile kanıtlanmıştır (25, 55). Bu konudaki üçüncü çalışmamızda ise bir lam üzerine yapıştırılmış eritrositler üzerinden fizyolojik tuz solüsyonu (PBS) akımı yapılarak hücrelere 0.1 Pa düzeyinde kayma kuvveti uygulanmıştır (Şekil 3) (54). Bu sırada hücre içi NO ve Ca²⁺ seviyeleri florasan probalar kullanılarak florometrik yöntemle ve gerçek zamanlı şekilde ölçülmüştür. Buna göre eritrositlere uygulanan kayma kuvveti, zaman içerisinde artacak şekilde eritrositlerde NO ve Ca²⁺ artışına neden olmaktadır (Şekil 4A-C). Bu çalışmalar eritrositlerde NO sentezine neden olan enzimatik mekanizmaların bulunduğunu doğrulamakta ve bu mekanizmaların hücreye uygulanan kayma kuvvetleriyle aktiveştiğini göstermektedir.



Şekil 3: Cam bir yüzeye yapıştırılmış eritrositler üzerinden akım sağlanarak hücrelere mekanik stres uygulanması ve gerçek zamanlı olarak NO ve Ca²⁺ ölçümü yapılan deney düzeneği (Ulker ve ark.; Nitric oxide, 2011).



Şekil 4: Mekanik strese maruz kalan eritrositlerde gerçek zamanlı hücre içi NO ölçümü. İlk ok işareti mekanik stresin başladığı; ikinci işaret ise sonlandığı zamanı göstermektedir (A). Eritrosit popülasyonunun akım uygulamasından önce (B) ve akım uygulaması sırasında faz-contrast mikroskopik görüntüleri (C). (Ulker ve ark.; Nitric oxide, 2011).

3) Eritrosit NOS Enzimi Kaynaklı NO'in Yerel Kan Akımına Etkisi

Eritrositlerden mekanik kuvvetlere cevaben enzimatik yollarla NO üretildiğinin ve plazmaya salındığının gösterilmesinin ardından eritrosit NOS enzimi kaynaklı NO'nun yerel kan akımının düzenlenmesinde fizyolojik bir öneme sahip olup olmadığı önemli bir soru olarak karşımıza çıkmıştır. Bu soruyu araştırmak üzere, eritrositlerin dolaşım sisteminde mekanik strese en çok maruz kaldığı bölgelerin mikrodolaşımdaki küçük çaplı arteriyoller olduğu göz önünde bulundurularak son çalışmamız planlanmıştır. Bu çalışmada endotel tabakası sıyrılmış 250-350 µm çapa sahip arteriyoller, fizyolojik koşulları taklid etmek üzere lümenlerinden eritrosit perfüzyonu sağlanacak şekilde iki ince cam kapiller tüp aracılığıyla damar banyosuna (basınç miyografi) asılmıştır (Şekil 5). Asılan damarlar 50 mm Hg damar iç basıncı oluşturulacak şekilde ve fizyolojik koşullarda dinlenime bırakılmıştır. Dinlenme süresinin sonunda arteriyollerin içinden önceden mekanik strese uğratarak NOS aktivasyonu sağlanmış olan eritrositler perfüze edilmiş ve bu sırada damar çaplarındaki değişim gerçek zamanlı olarak izlenmiştir. Çalışmamızın sonuçlarına göre önceden meka-



Şekil 5: Sabit basınç ve akım koşullarında damar perfüzyonu gerçekleştirilen ve gerçek zamanlı damar çapı ölçümünün yapıldığı basınç miyografi düzeneği (Ulker ve ark.; Clin Hemor; 2013).

nik strese uğratılmış eritrositlerin arteriyollerden perfüzyonu damar çapında önemli artışa neden olmuş ve bu artış NOS inhibitörü ile ortadan kalkmıştır (56). Bu çalışma ile eritrosit NOS enzimi tarafından üretilen NO'nun damar çapında artışa neden olduğu ilk kez ortaya konularak bu enzimin kan akımının yerel düzenlenmesinde fizyolojik bir öneme sahip olabileceği ilk kez gösterilmiştir.

KAYNAKLAR

1. Ellsworth ML, Forrester T, Ellis CG, Dietrich HH. The erythrocyte as a regulator of vascular tone. *Am J Physiol* 1995; 269(6 Pt 2): H2155-61.
2. Cosby K, Partovi KS, Crawford JH, Patel RP, Reiter CD, Martyr S, Yang BK, Wacławski MA, Zalos G, Xu X, Huang KT, Shields H, Kim-Shapiro DB, Schechter AN, Cannon RO 3rd, Gladwin MT. Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. *Nat Med* 2003; 9(12): 1498-505.

3. Jia L, Bonaventura C, Bonaventura J, Stamler JS. S-nitrosohaemoglobin: A dynamic activity of blood involved in vascular control. *Nature* 1996; 380(6571): 221-6.
4. Barvitenko NN, Adragna NC, Weber RE. Erythrocyte signal transduction pathways, their oxygenation dependence and functional significance. *Cell Physiol Biochem* 2005; 15(1-4): 1-18.
5. Datta B, Tufnell-Barrett T, Bleasdale RA, Jones CJ, Beeton I, Paul V, Frenneaux M, James P. Red blood cell nitric oxide as an endocrine vasoregulator: A potential role in congestive heart failure. *Circulation* 2004; 109(11): 1339-42.

6. Gladwin MT, Crawford JH, Patel RP. The biochemistry of nitric oxide, nitrite, and hemoglobin: Role in blood flow regulation. *Free Radic Biol Med* 2004; 36(6): 707-17.
7. Diesen DL, Hess DT, Stamler JS. Hypoxic vasodilation by red blood cells: Evidence for an s-nitrosothiol-based signal. *Circ Res* 2008; 103(5): 545-53.
8. Sprague RS, Hanson MS, Achilleus D, Bowles EA, Stephenson AH, Sridharan M, Adderley S, Procknow J, Ellsworth ML. Rabbit erythrocytes release ATP and dilate skeletal muscle arterioles in the presence of reduced oxygen tension. *Pharmacol Rep* 2009; 61(1): 183-90.
9. Miseta A, Bogner P, Berényi E, Kellermayer M, Galambos C, Wheatley DN, Cameron IL. Relationship between cellular ATP, potassium, sodium and magnesium concentrations in mammalian and avian erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1175(2): 133-9.
10. Bergfeld GR, Forrester T. Release of ATP from human erythrocytes in response to a brief period of hypoxia and hypercapnia. *Cardiovasc Res* 1992; 26(1): 40-7.
11. You J, Johnson TD, Childres WF, Bryan RM Jr. Endothelial-mediated dilations of rat middle cerebral arteries by ATP and ADP. *Am J Physiol* 1997; 273(3 Pt 2): H1472-7.
12. Sprague RS, Ellsworth ML, Stephenson AH, Lonigro AJ. ATP: The red blood cell link to NO and local control of the pulmonary circulation. *Am J Physiol* 1996; 271(6 Pt 2): H2717-22.
13. Sprague RS, Ellsworth ML, Stephenson AH, Kleinhenz ME, Lonigro AJ. Deformation-induced ATP release from red blood cells requires CFTR activity. *Am J Physiol* 1998; 275(5 Pt 2): H1726-32.
14. Sprague RS, Stephenson AH, Bowles EA, Stumpf MS, Lonigro AJ. Reduced expression of G(i) in erythrocytes of humans with type 2 diabetes is associated with impairment of both cAMP generation and ATP release. *Diabetes* 2006; 55(12): 3588-93.
15. Ellsworth ML. The red blood cell as an oxygen sensor: What is the evidence? *Acta Physiol Scand* 2000; 168(4): 551-9.
16. Jagger JE, Bateman RM, Ellsworth ML, Ellis CG. Role of erythrocyte in regulating local O₂ delivery mediated by hemoglobin oxygenation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280(6): H2833-9.
17. Olarczyk JJ, Stephenson AH, Lonigro AJ, Sprague RS. Receptor-mediated activation of the heterotrimeric G-protein G_s results in ATP release from erythrocytes. *Med Sci Monit* 2001; 7(4): 669-74.
18. Han TH, Hyduke DR, Vaughn MW, Fukuto JM, Liao JC. Nitric oxide reaction with red blood cells and hemoglobin under heterogeneous conditions. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(11): 7763-8.
19. Vaughn MW, Kuo L, Liao JC. Effective diffusion distance of nitric oxide in the microcirculation. *Am J Physiol* 1998; 274(5 Pt 2): H1705-14.
20. Liao JC, Hein TW, Vaughn MW, Huang KT, Kuo L. Intravascular flow decreases erythrocyte consumption of nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(15): 8757-61.
21. Stamler JS, Jia L, Eu JP, McMahon TJ, Demchenko IT, Bonaventura J, Gernert K, Piantadosi CA. Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient. *Science* 1997; 276(5321): 2034-7.
22. Azarov I, Huang KT, Basu S, Gladwin MT, Hogg N, Kim-Shapiro DB. Nitric oxide scavenging by red blood cells as a function of hematocrit and oxygenation. *J Biol Chem* 2005; 280(47): 39024-32.
23. Rifkind JM, Nagababu E, Cao Z, Barbiro-Michaely E, Mayevsky A. Nitrite-induced improved blood circulation associated with an increase in a pool of RBC-NO with no bioactivity. *Adv Exp Med Biol* 2009; 645: 27-34.
24. Kleinbongard P, Schulz R, Rassaf T, Lauer T, Dejam A, Jax T, Kumara I, Gharini P, Kabanova S, Özüyaman B, Schnürch HG, Gödecke A, Weber AA, Robenek M, Robenek H, Bloch W, Rösen P, Kelm M. Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase. *Blood* 2006; 107(7): 2943-51.
25. Ulker P, Sati L, Celik-Ozenci C, Meiselman HJ, Baskurt OK. Mechanical stimulation of nitric oxide synthesizing mechanisms in erythrocytes. *Biorheology* 2009; 46(2): 121-32.
26. Barry W, Allen JSS, Clude A, Piantadosi, Hemoglobin, nitric oxide and molecular mechanisms of hypoxic vasodilation. *Trends in molecular medicine* 2009. Article in press.
27. Allen BW, Piantadosi CA. How do red blood cells cause hypoxic vasodilation? The SNO-hemoglobin paradigm. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 291(4): H1507-12.
28. Myers PR, Minor RL Jr, Guerra R Jr, Bates JN, Harrison DG. Vasorelaxant properties of the endothelium-derived relaxing factor more closely resemble S-nitrosocysteine than nitric oxide. *Nature* 1990; 345(6271): 161-3.
29. Dufour SP, Patel RP, Brandon A, Teng X, Pearson J, Barker H, Ali L, Yuen AH, Smolenski RT, González-Alonso J. Erythrocyte-dependent regulation of human skeletal muscle blood flow: Role of varied oxyhemoglobin and exercise on nitrite, S-nitrosohemoglobin, and ATP. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010; 299(6): H1936-46.
30. Doyle MP, Pickering RA, DeWeert TM, Hoekstra JW, Pater D. Kinetics and mechanism of the oxidation of human deoxyhemoglobin by nitrites. *J Biol Chem* 1981; 256(23): 12393-8.
31. 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. Inhaled nebulized nitrite is a hypoxia-sensitive NO-dependent selective pulmonary vasodilator. *Nat Med* 2004; 10(10): 1122-7.

32. Rhodes P, Leone AM, Francis PL, Struthers AD, Moncada S, Rhodes P. The L-arginine: Nitric oxide pathway is the major source of plasma nitrite in fasted humans. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 209(2): 590-6.
33. Gödecke A, Decking UK, Ding Z, Hirchenhain J, Bidmon HJ, Gödecke S, Schrader J. Coronary hemodynamics in endothelial NO synthase knockout mice. *Circ Res* 1998;82(2): 186-94.
34. 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. Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals. *Free Radic Biol Med* 2003; 35(7): 790-6.
35. Meulemans A, Delsenne F. Measurement of nitrite and nitrate levels in biological samples by capillary electrophoresis. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1994; 660(2): 401-4.
36. Gorenflo M, Zheng C, Pöge A, Bettendorf M, Werle E, Fiehn W, Ulmer HE. Metabolites of the L-arginine-NO pathway in patients with left-to-right shunt. *Clin Lab* 2001; 47(9-10): 441-7.
37. Dejam A, Hunter CJ, Pelletier MM, Hsu LL, Machado RF, Shiva S, Power GG, Kelm M, Gladwin MT, Schechter AN. Erythrocytes are the major intravascular storage sites of nitrite in human blood. *Blood* 2005; 106(2): 734-9.
38. Jensen FB. Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2003; 135(1): 9-24.
39. May JM, Qu ZC, Xia L, Cobb CE. Nitrite uptake and metabolism and oxidant stress in human erythrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 279(6): C1946-54.
40. Webb AJ, Milsom AB, Rathod KS, Chu WL, Qureshi S, Lovell MJ, Lecomte FM, Perrett D, Raimondo C, Khoshbin E, Ahmed Z, Uppal R, Benjamin N, Hobbs AJ, Ahluwalia A. Mechanisms underlying erythrocyte and endothelial nitrite reduction to nitric oxide in hypoxia: role for xanthine oxidoreductase and endothelial nitric oxide synthase. *Circ Res* 2008; 103(9): 957-64.
41. Huang Z, Shiva S, Kim-Shapiro DB, Patel RP, Ringwood LA, Irby CE, Huang KT, Ho C, Hogg N, Schechter AN, Gladwin MT. Enzymatic function of hemoglobin as a nitrite reductase that produces NO under allosteric control. *J Clin Invest* 2005; 115(8): 2099-107.
42. Crawford JH, Isbell TS, Huang Z, Shiva S, Chacko BK, Schechter AN, Darley-Usmar VM, Kerby JD, Lang JD Jr, Kraus D, Ho C, Gladwin MT, Patel RP. Hypoxia, red blood cells, and nitrite regulate NO-dependent hypoxic vasodilation. *Blood* 2006; 107(2): 566-74.
43. Ignarro LJ, Gruetter CA. Requirement of thiols for activation of coronary arterial guanylate cyclase by glyceryl trinitrate and sodium nitrite: Possible involvement of S-nitrosothiols. *Biochim Biophys Acta* 1980; 631(2): 221-31.
44. Moulds RF, Jauernig RA, Shaw J. A comparison of the effects of hydrallazine, diazoxide, sodium nitrite and sodium nitroprusside on human isolated arteries and veins. *Br J Clin Pharmacol* 1981; 11(1): 57-61.
45. Lancaster JR Jr. Simulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91(17): 8137-41.
46. Buerk DG. Nitric oxide regulation of microvascular oxygen. *Antioxid Redox Signal* 2007; 9(7): 829-43.
47. Chen K, Pikhova B, Pittman RN, Schechter AN, Popel AS. Nitric oxide from nitrite reduction by hemoglobin in the plasma and erythrocytes. *Nitric Oxide* 2008; 18(1): 47-60.
48. Moncada S. Nitric oxide in the vasculature: Physiology and pathophysiology. *Ann N Y Acad Sci* 1997; 811: 60-7; discussion 67-9.
49. Kang ES, Ford K, Grokulsky G, Wang YB, Chiang TM, Acchiardo SR. Normal circulating adult human red blood cells contain inactive NOS proteins. *J Lab Clin Med* 2000; 135(6): 444-51.
50. Bratosin D, Estaquier J, Petit F, Arnoult D, Quatannens B, Tissier JP, Slomianny C, Sartiaux C, Alonso C, Huart JJ, Montreuil J, Ameisen JC. Programmed cell death in mature erythrocytes: A model for investigating death effector pathways operating in the absence of mitochondria. *Cell Death Differ* 2001; 8(12): 1143-56.
51. Özüyan B, Grau M, Kelm M, Merx MW, Kleinbongard P. RBC NOS: Regulatory mechanisms and therapeutic aspects. *Trends Mol Med* 2008; 14(7): 314-22.
52. Carvalho FA, Mesquita R, Martins-Silva J, Saldanha C. Acetylcholine and choline effects on erythrocyte nitrite and nitrate levels. *J Appl Toxicol* 2004; 24(6): 419-27.
53. Fischer UM, Schindler R, Brixius K, Mehlhorn U, Bloch W. Extracorporeal circulation activates endothelial nitric oxide synthase in erythrocytes. *Ann Thorac Surg* 2007; 84(6): 2000-3.
54. Ulker P, Yaras N, Yalcin O, Celik-Ozenci C, Johnson PC, Meiselman HJ, Baskurt OK. Shear stress activation of nitric oxide synthase and increased nitric oxide levels in human red blood cells. *Nitric Oxide* 2011; 24(4): 184-91.
55. Ulker P, Meiselman HJ, Baskurt OK. Nitric oxide generation in red blood cells induced by mechanical stress. *Clin Hemorheol Microcirc* 2010; 45(2-4): 169-75.
56. Ulker P, Gunduz F, Meiselman HJ, Baskurt OK. Nitric oxide generated by red blood cells following exposure to shear stress dilates isolated small mesenteric arteries under hypoxic conditions. *Clin Hemorheol Microcirc* 2013; 54(4): 357-69.