

# L-NAME誘発性高血圧ラットの血圧に対する亜硝酸塩とニフェジピンの相互作用

Interaction between nitrite and nifedipine in blood pressure of L-NAME-induced hypertensive rat.

藺田 邦博<sup>1)</sup> 大竹 一男<sup>2)</sup> 内田 博之<sup>3)</sup>  
玉田 葉月<sup>4)</sup> 小林 順<sup>3)</sup>

金城学院大学生活環境学部食環境栄養学科<sup>1)</sup>

城西大学薬学部薬学科<sup>2)</sup>

城西大学薬学部医療栄養学科<sup>3)</sup>

協同乳業株式会社研究所<sup>4)</sup>

Kunihiro Sonoda<sup>1)</sup> Kazuo Ohtake<sup>2)</sup> Hiroyuki Uchida<sup>3)</sup>  
Hazuki tamada<sup>4)</sup> Jun Kobayashi<sup>3)</sup>

Department of Food and Nutritional Environment, College of Human Life and Environment, Kinjo Gakuin University, Nagoya, Japan<sup>1)</sup>

Division of Pharmaceutics, School of Pharmaceutical Sciences,

Faculty of Pharmaceutical Science, Josai University, Saitama, Japan<sup>2)</sup>

Division of Pathophysiology, Department of Clinical Dietetics and Human Nutrition, Faculty of Pharmaceutical Science, Josai University, Saitama, Japan<sup>3)</sup>

Research Laboratories, Kyodo Milk Industry Co., Ltd, Tokyo Japan<sup>4)</sup>

キーワード：亜硝酸塩、一酸化窒素、ニフェジピン、高血圧、相互作用

## 概要

食品成分で血管拡張作用を示す一酸化窒素（NO）を産生する亜硝酸塩と臨床的に汎用されているジヒドロピリミジン系のカルシウム拮抗薬の併用投与による血圧と、それぞれの成分の体内動態に対する相互作用について検討した。SD系雄性ラットに一酸化窒素合成阻害剤（L-NAME）を3週間投与し、内因性NO産生不足高血圧ラットを作成した。本ラットに亜硝酸塩（経口投与）とニフェジピン（腹腔内投与）を単独、または併用投与し60分間の血圧を測定した。さらに、血液中の亜硝酸イオンと硝酸イオン量、およびニフェジピン濃度をHPLC法により測定した。その結果、血圧は両成分とも投与量依存的な効果を示し、併用投与では血圧降下作用が増強した。その際の、血中ニフェジピン濃度は単独と併用で有意差を認めなかった。しかし、血漿中の亜硝酸イオンは単独に比べ併用投与でT<sub>max</sub>の遅延とC<sub>max</sub>の増加が認められた。以上のことから、亜硝酸塩とニフェジピンの併用は血圧に対して相互作用を示すことが明らかになった。また、この相互作用はニフェジピンが亜硝酸塩（または、亜硝酸塩から生成されたNO）の代謝や消失に影響を与えたことによる薬物動態学的な相互作用であることが示唆された。

## はじめに

現在、薬物間の相互作用については多くの研究報告があるが、食品と薬物間（または食品間）の相互作用は未だ明らかとなっていないものが多数存在している。食品成分と薬物間の相互作用を明らかにしていくことは副作用（有害作用）の回避や疾患の治療に重要な影響を与えるため臨床的意義が大きい。

現在、臨床的に汎用されているカルシウム拮抗薬のニフェジピンは、ジヒドロピリミジン系に分類され、血管平滑筋細胞や心筋細胞の細胞膜表面に発現しているL型のカルシウムチャネルを阻害することによって細胞内へのカルシウムイオン流入を抑制し、血圧降下作用を示す<sup>1)</sup>。一方、同じ平滑筋細胞に働き血圧降下作用を示す物質に一酸化窒素（NO）がある。NOは、強力な血管拡張因子として知られており、血管内皮細胞内でL-アルギニンからNO合成酵素によって産生される。内皮細胞で作られたNOは平滑筋細胞のグアニル酸シクラーゼ（sGC）を活性化、次いで環状グアノシンーリン酸（cGMP）を生成し、細胞内のカルシウムイオン濃度を低下させ血圧を低下させる<sup>2)</sup>。

この内皮細胞からのNO産生機構以外に外因的なNOの供給源として野菜や果物に多く含まれている硝酸塩や亜硝酸塩から産生される経路がある<sup>3)</sup>。この経路では、食事から摂取された硝酸塩が腸-唾液循環を経て口腔内に分泌されると硝酸塩還元酵素を有する口腔内細菌により亜硝酸塩に変換される<sup>4)</sup>。その後、胃内酸性条件下<sup>4, 5)</sup>、生体内のキサンチン酸化還元酵素（XOR）<sup>6-8)</sup>、ミトコンドリアアルデヒド脱水素酵素（ALDH2）<sup>8, 9)</sup>、デオキシヘモグロビン<sup>10)</sup>、デオキシミオグロビン<sup>11)</sup>、チオール類<sup>12, 13)</sup>などによりNOに還元され恒常的に生体内でNOを産生する。また、外因的な亜硝酸塩を処置することによりcGMPの増加<sup>11)</sup>や血圧降下作用<sup>8, 14)</sup>を示すことが報告されている。しかしながら、現在、日常的に摂取しているNO供給物質の亜硝酸塩と降圧薬のニフェジピンの併用投与における相互作用を検討した報告は無い。そこで本研究では、亜硝酸塩とニフェジピンの併用投与における血圧降下作用への影響と両成分の血中動態に対する影響について検討したので報告する。

なお、本研究ではニフェジピンが血管内皮細胞由来のNO産生を増加させるという報告<sup>15-17)</sup>があったことから、NO合成阻害剤（L-NAME）を用い内因性NOの影響を最小限にした高血圧モデルラットを用いた。

## 方法

### 1. 試薬・試料

亜硝酸ナトリウム、ニフェジピン<sup>®</sup>、HPLC用アセトニトリル、特級メタノールを和光純薬工業株式会社（大阪）、ヘパリンNaを持田製薬株式会社（東京）、Inactin<sup>®</sup>をSigma-Aldrich（St. Louis, MO, USA）より購入した。

## 2. 高血圧モデルラットの作成と血圧測定

体重250-350 g 7週齢Sprague-Dawley雄性ラット（東京実験動物株式会社、東京）にN<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (BACHEM AG, Bubendorf, Switzerland) を1 g/Lで調整し、3週間自由飲水投与し内因的なNO産生を抑制した高血圧モデル動物を作成した<sup>14)</sup>。本ラットにInactin麻酔（80 mg/kg i.p.）を処置した後、血圧を測定するため後肢大腿動脈にヘパリン生理食塩液で満たしたPE50のチューブを留置した。その後、亜硝酸塩は、0.1, 0.2, 0.4, 0.8 mmol/kgの投与量で経口投与し、ニフェジピンは0.5, 1, 2, 5 mg/kgで腹腔内投与した。コントロールには生理食塩水を経口および腹腔に投与した。併用投与においては、亜硝酸塩とニフェジピンをそれぞれ経口と腹腔に投与した。

投与後の血圧は、PowerLab 4/30 system (ADInstruments, Dunedin, New Zealand) により連続的に60分間測定し、LabChart v5.2 (ADInstruments, Dunedin, New Zealand) のマクロプログラムに従い5分間の血圧を平均した。その後、60分間の血圧下面積（AUC: Area under the curve）を算出した<sup>8)</sup>。

## 3. 血漿中ニフェジピンの測定

麻酔後、採血用に左鎖骨下静脈を露出し、ニフェジピンの単独投与、及び亜硝酸塩との併用投与を行い0, 5, 10, 15, 30, 60, 90分で採血（0.5 ml）した。採取した血液は、遠心分離機（10,000 g × 5分 4℃）にかけた後、血漿を採取して-30℃で保存した。血漿は、100 μLをマイクロチューブに分注し、タンパク質除去のためアセトニトリル180 μLと内部標準としてn-propylparaben（10 μg/mL）を20 μL加えボルテックスミキサーで混和後、遠心分離（10,000 g × 5分 4℃）した。上清200 μLを新たなマイクロチューブに移し、濃縮遠心機に45℃で90分間かけた後、移動相（アセトニトリル：0.01 M リン酸緩衝液, pH6.1 = 45 : 55）20 μLにて再溶解し、以下のHPLCの条件下で測定を行った。固定相には、TSKgelODS-120A（東ソー株式会社、東京）、TSKguadgelODS-120A（東ソー株式会社、東京）カラムを使用し、移動相を毎分1 mLの流速で用いUV-2075検出器（日本分光株式会社、東京）にて検出波長236 nmでニフェジピンと内部標準（n-propylparaben）の濃度を測定した。

## 4. 血漿中NO<sub>x</sub> (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) の測定

麻酔後、採血用に左鎖骨下静脈を露出し、亜硝酸塩の単独投与、及びニフェジピンとの併用投与を行い0, 5, 10, 15, 30, 60, 90分で採血（0.5 ml）した。採取した血液は、遠心分離機（10,000 g × 5分 4℃）にかけた後、血漿を採取して-30℃で保存した。血漿50 μLをマイクロチューブに分注し、タンパク質除去のためメタノール50 μLを加えボルテックスミキサーで混和後、遠心分離（10,000 g × 5分 4℃）した。上清10 μLを用いてグリース法を基にしたHPLCシステム（E-NO20、株式会社エイコム、京都）にて血中のNO<sub>x</sub>濃度を測定した<sup>18)</sup>。

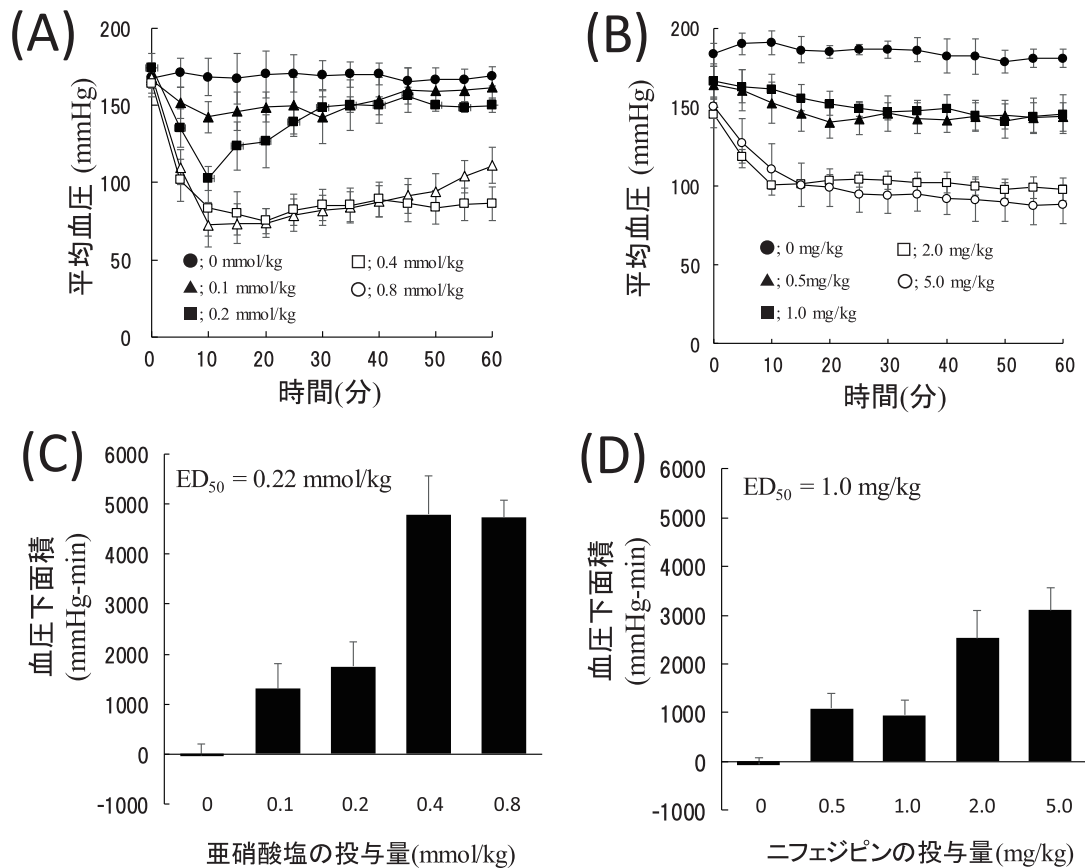


図1 亜硝酸塩とニフェジピンの単独投与による血圧降下作用

(A) 亜硝酸塩の経口投与による血圧降下作用、(B) ニフェジピンの腹腔内投与による血圧降下作用、(C) 亜硝酸塩の血圧降下作用から算出した血圧下面積、(D) ニフェジピンの血圧降下作用から算出した血圧下面積。平均値±標準誤差 (n = 4 to 5)

## 5. 統計解析

数値データは、平均±標準偏差で示した。3群以上の検定は、Tukey-Kramer testを用い比較した。2群間の比較は、Student's *t*-testにより行った。これらの統計解析はStat Mate V (株式会社アトムス、東京) を用い、 $p < 0.05$ を統計学的に有意とした。

### 結果

#### 1) 亜硝酸塩とニフェジピンの単独投与による血圧降下作用に対する影響

L-NAMEを3週間摂取させ、内因性NOの低下させた高血圧ラットに亜硝酸塩 (経口投与)、またはニフェジピン (腹腔内投与) し、以後60分間の血圧を連続的に測定したところ、図1 A および B に示すような結果が得られた。また、両物質とも60分間の血圧下面積 (AUC<sub>0-60min</sub>) が投与量に依存して増加した (図1 C, D)。

血圧下面積 (AUC<sub>0-60min</sub>) を用いHill plot法でED<sub>50</sub>を算出して併用投与における投与量を設定した。その結果、亜硝酸塩は、0.22 mmol/kg、ニフェジピンは1.0 mg/kgとなった。この値より、併用投与時の投与量を亜硝酸塩0.1 mmol/kgおよび0.2 mmol/kg、ニフェジピン 1 mg/kgと設

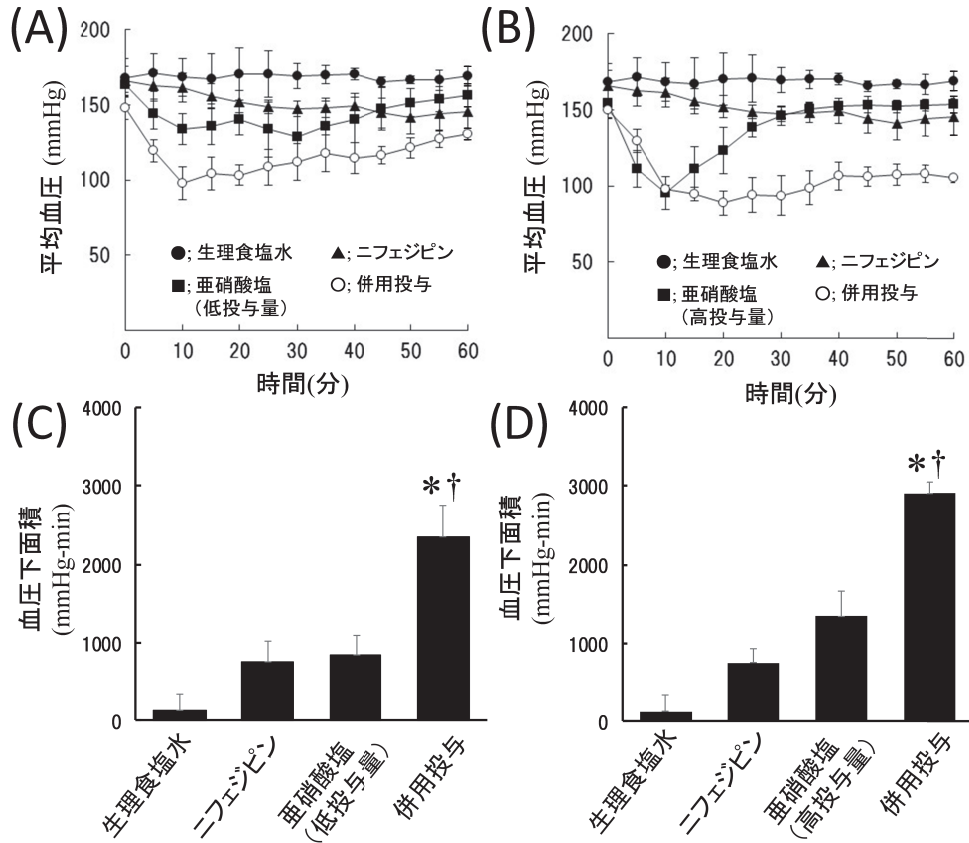


図2 亜硝酸塩とニフェジピンの併用投与による血圧降下作用

(A) 亜硝酸塩 (0.1 mmol/kg) とニフェジピン (1 mg/kg) 投与による血圧降下作用、(B) 亜硝酸塩 (0.2 mmol/kg) とニフェジピン (1 mg/kg) 投与による血圧降下作用、(C) 亜硝酸塩 (0.1 mmol/kg) とニフェジピン (1 mg/kg) 投与による血圧下面積、(D) 亜硝酸塩 (0.2 mmol/kg) とニフェジピン (1 mg/kg) 投与による血圧下面積。平均値 ± 標準誤差 (n = 4)。Tukey-Kramer test : \* $p < 0.05$  v.s. 亜硝酸塩単独、† $p < 0.05$  v.s. ニフェジピン単独

定した。

## 2) 亜硝酸塩とニフェジピンの併用投与による血圧降下作用に対する影響

亜硝酸塩とニフェジピンの併用投与時の血圧降下作用を、それぞれの単独投与の値と比較した (図2 A, B)。その結果、併用投与時の血圧下面積 ( $AUC_{0-60min}$ ) が、それぞれの単独投与よりも有意に増加した (図2 C, D)。

## 3) 亜硝酸塩とニフェジピンの併用投与による血中ニフェジピンの血中動態に対する影響

亜硝酸塩およびニフェジピン単独もしくは併用投与時の血中ニフェジピン濃度を測定し、ニフェジピン血中動態を比較した (図3)。このときの投与量はそれぞれ、亜硝酸塩0.2 mmol/kg、ニフェジピン1 mg/kgとした。血中ニフェジピン濃度の推移において、両群間に有意な差はなかった。さらに、 $T_{max}$ 、 $C_{max}$ 、 $AUC$ を算出して両群間を比較したが統計学的に有意な差は認められなかった (表1)。

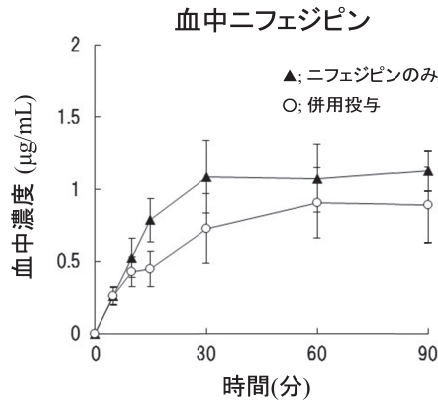


図3 亜硝酸塩とニフェジピンの併用投与による血中ニフェジピン濃度の推移  
 平均値 ± 標準誤差 (n = 5)

表1 亜硝酸塩とニフェジピンの併用投与によるニフェジピンの血中動態への影響

測定成分	投与量	C <sub>max</sub> (μg/mL)	T <sub>max</sub> (分)	AUC <sub>0-90min</sub> (μmol/L)
ニフェジピン	ニフェジピン(1 mg/kg)	1.1 ± 0.1	72.0 ± 30.0	85.3 ± 15.2
	亜硝酸塩(0.2 mmol/kg) + ニフェジピン(1 mg/kg)	1.0 ± 0.3	62.0 ± 37.7	75.7 ± 17.8

平均値 ± 標準誤差 (n = 5)

#### 4) 亜硝酸塩とニフェジピンの併用投与による血中窒素酸化物 (NOx) の血中動態に対する影響

実験3同様にニフェジピン 1 mg/kgと亜硝酸塩0.2 mmol/kgを用い、亜硝酸塩単独投与時およびニフェジピンとの併用投与時の血中亜硝酸イオンおよび硝酸イオン濃度を比較した(図4)。亜硝酸塩とニフェジピンの併用投与により、投与後30分時点における亜硝酸イオン濃度が単独投与時と比較して有意に上昇した。さらに、T<sub>max</sub>、C<sub>max</sub>、AUCを算出して両群間を比較したところ、併用投与時のT<sub>max</sub>およびC<sub>max</sub>が単独投与時より有意に増加した。しかし、AUCには有意な差は無かった(表2)。

#### 考察

食品と薬物間との相互作用は、双方の体内動態、薬理効果、副作用に影響する重要な問題である。今回、我々は内因的なNO合成酵素を介したNO産生をL-アルギニンのアナログ型のL-NAMEにより阻害した上で、血管弛緩作用を示す亜硝酸塩とL型カルシウム拮抗薬であるニフェジピンの相互作用を血圧降下作用(薬理作用)と両成分の血中濃度推移(薬物動態学的パラメーター)より検討した。

内因的なNO合成を阻害した条件下で亜硝酸塩(経口投与)とニフェジピン(腹腔内投与)を単独で投与すると投与量依存的な血圧降下作用を示した(図1 A-D)。さらに、亜硝酸塩

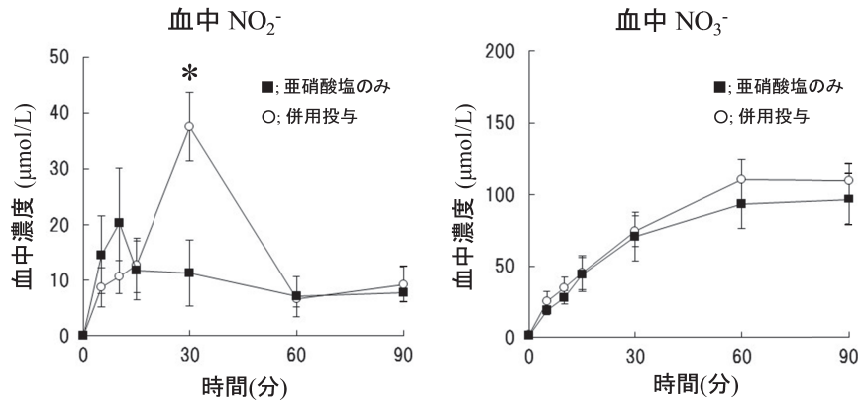


図4 亜硝酸塩とニフェジピンの併用投与による血中NO<sub>x</sub>濃度推移

平均値 ± 標準誤差 (n = 5)

Student's *t*-test : \**p*<0.05 v.s. 亜硝酸塩単独

表2 亜硝酸塩とニフェジピンの併用投与による亜硝酸塩の血中動態への影響

測定成分	投与量	C <sub>max</sub> (μg/mL)	T <sub>max</sub> (分)	AUC <sub>0-90min</sub> (μmol/L)
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	亜硝酸塩(0.2 mmol/kg)	20.3 ± 9.9	15.0 ± 5.4	876.8 ± 223.2
	亜硝酸塩 (0.2 mmol/kg) + ニフェジピン(1 mg/kg)	37.6 ± 6.1*	30.0 ± 0.0*	824.0 ± 71.2
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	亜硝酸塩(0.2 mmol/kg)	96.5 ± 17.0	82.5 ± 7.5	6500.9 ± 1224.5
	亜硝酸塩 (0.2 mmol/kg) + ニフェジピン(1 mg/kg)	110.2 ± 13.6	75.0 ± 8.7	7979.7 ± 1115.3

平均値 ± 標準誤差 (n = 5)

Student's *t*-test : \**p*<0.05 v.s. 亜硝酸塩単独

とニフェジピンを併用投与すると単独投与に比べ血圧降下作用の延長が見られ (図2 A, B)、血圧下面積が有意に増加した (図2 C, D)。NOは、ニフェジピンの代謝酵素でもあるP450のヘム部位に結合し、酵素活性を低下させることが報告されている<sup>19)</sup>。そこで、血中のニフェジピンの血中動態について検討したが、ニフェジピンの単独投与と亜硝酸ナトリウムとの併用投与の間に統計的に有意な差はみられなかった (図3, 表1)。一方、血中の亜硝酸イオンについては亜硝酸塩の単独投与に比べて、併用投与でC<sub>max</sub>が40%増加し、T<sub>max</sub>が15分遅延した (図4, 表2)。

ニフェジピンは、内因性の血管内皮細胞由来のNO産生を増加させることが知られている<sup>15-17)</sup>。しかし、本研究では内因性のNOS由来NO産生をL-NAMEで遮断しているため内因的なNOの影響はほとんど受けないと推察される。従って、本研究で認められた亜硝酸イオンの増加は、血管内皮細胞から生成されたNOの代謝産物である可能性は低い。一方、LupoらやYamatoらは、ニフェジピンに抗酸化作用があることを報告している<sup>20, 21)</sup>。さらに、Berkelsらは、培養したブタ内皮細胞を用いニフェジピンの抗酸化作用によりNOの生物学的利用率を増

加させることを報告している<sup>22)</sup>。一方、本研究で用いたL-NAMEを慢性的に投与すると、頸動脈組織中のスーパーオキシドラジカルが増加し、酸化ストレスのマーカーであるマロンジアルデヒドやカルボニル化タンパク質が血中で増加することが確認されている<sup>23)</sup>。さらに、肺組織においてスーパーオキシドラジカルを生成するNADPH酸化酵素の発現量が増加することが報告されている<sup>24)</sup>。

これらのことから、本研究における血中の亜硝酸イオンの増加や遅延はL-NAME投与で起こる活性酸素種の増加をニフェジピンが抑制し、亜硝酸イオン（もしくは、亜硝酸塩から生成されたNO）の生物学的利用率を増加させることが推察され、結果として、亜硝酸塩から持続的にNOが供給され血圧降下作用が延長したものと考えられた。しかし、Huらによると、S-ニトロソチオールは、ニフェジピンが作用するL型カルシウムチャネルに直接作用する<sup>25)</sup>。亜硝酸塩は、生体内で一部チオール類と反応してS-ニトロソチオールを形成する<sup>12, 13)</sup> ことからL型カルシウムチャネルにも作用を示した可能性も考えられる。従って、今回の研究における相乗的な血圧降下作用の出現は薬理的な相互作用であった可能性は否定できない。そのため、薬理的な相互作用についても今後、検討する必要があると思われる。

本研究で用いた、ニフェジピンの投与量はヒトの最大投薬量である1日80 mg/day（成人60 kg：1.3 mg/kg/day）とほぼ同等の投与量である。亜硝酸塩は、高血圧予防のための食事であるDASH食で考えると、DASH食では硝酸塩を約1200 mg摂取している<sup>3)</sup>、そのうち5%（60 mg）の硝酸塩（46 mg/kgの亜硝酸塩に相当）が胃内に入ることが報告されている<sup>26)</sup>。体重60 kgあたりで約0.77 mg/kg/day（亜硝酸ナトリウムで換算すると0.011 mol/kg/day）となる。従って、本研究で用いた投与量（0.1 mmol/kgと0.2 mmol/kg）は、ヒトが摂取する1日の亜硝酸塩摂取量の10～20倍程度を1回で投与していることになる。そのため、今後の研究では投与量をより少なくし日常的な摂取量で相互作用の出現の有無を検討していく必要がある。しかし、亜硝酸塩は腸-唾液循環系により常に硝酸塩から作られるため硝酸塩を多く含んだ野菜や果実を多量に摂取した場合、一過的に亜硝酸塩の生成量が増加することが予想される。従って、亜硝酸塩とニフェジピンによる相互作用が起こる可能性があるため、野菜を多く食事に取り入れている人がニフェジピンを常用している場合は、血圧の急激な低下に注意が必要である。

以上のことから、亜硝酸塩とニフェジピンの同時に摂取することで相乗的な血圧降下作用を起こす可能性があり、この相互作用のメカニズムの1つとしてニフェジピンが亜硝酸塩の体内動態に影響を与えるという薬物動態学的なメカニズムが寄与していることが示唆された。

## 引用文献

- 1) Frishman WH. Current status of calcium channel blockers. *Curr Probl Cardiol*. 1994; 19: 637-688.
- 2) Ignarro L.J. Haem-dependent activation of guanylate cyclase and cyclic GMP formation by endogenous nitric oxide: A unique transduction mechanism for transcellular signalling.



- Pharmacol. Toxicol.* 1990; 67: 1–7.
- 3) N.G. Hord, Y. Tang, N.S. Bryan. Food sources of nitrates and nitrites: the physiologic context for potential health benefits. *Am. J. Clin. Nutr.* 2009; 90: 1–10.
  - 4) Lundberg JO, Weitzberg E, Lundberg JM, Alving K. Intra-gastric nitric oxide production in humans: measurements in expelled air. *Gut.* 1994; 35: 1543–6.
  - 5) Benjamin N, O'Driscoll F, Dougall H, Duncan C, Smith L, Golden M, McKenzie H. Stomach NO synthesis. *Nature.* 1994; 368: 502.
  - 6) Ghosh SM, Kapil V, Fuentes-Calvo I, Bubb KJ, Pearl V, Milsom AB, Khambata R, Maleki-Toyserkani S, Yousuf M, Benjamin N, Webb AJ, Caulfield MJ, Hobbs AJ, Ahluwalia A. Enhanced vasodilator activity of nitrite in hypertension: critical role for erythrocytic xanthine oxidoreductase and translational potential. *Hypertension.* 2013; 61(5): 1091–102.
  - 7) Peleli M, Zollbrecht C, Montenegro MF, Hezel M, Zhong J, Persson EG, Holmdahl R, Weitzberg E, Lundberg JO, Carlström M. Enhanced XOR activity in eNOS-deficient mice: Effects on the nitrate-nitrite-NO pathway and ROS homeostasis. *Free Radic Biol Med.* 2016; 99: 472–484.
  - 8) Sonoda K, Ohtake K, Kubo Y, Uchida H, Uchida M, Natsume H, Kobayashi M, Kobayashi J. Aldehyde dehydrogenase 2 partly mediates hypotensive effect of nitrite on L-NAME-induced hypertension in normoxic rat. *Clin Exp Hypertens.* 2014; 36(6): 410–8.
  - 9) Badejo AM Jr, Hodnette C, Dhaliwal JS, Casey DB, Pankey E, Murthy SN, Nossaman BD, Hyman AL, Kadowitz PJ. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase mediates vasodilator responses of glyceryl trinitrate and sodium nitrite in the pulmonary vascular bed of the rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010; 299(3): H819–26.
  - 10) Cosby K, Partovi KS, Crawford JH, et al. Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. *Nat Med.* 2003; 9: 1498–505.
  - 11) Shiva S, Rassaf T, Patel RP, and Gladwin MT. The detection of the nitrite reductase and NO-generating properties of haemoglobin by mitochondrial inhibition. *Cardiovasc Res.* 2011; 89(3): 566–573.
  - 12) Dezfulian C, Alekseyenko A, Dave KR, Raval AP, Do R, Kim F, Perez-Pinzon MA. Nitrite therapy is neuroprotective and safe in cardiac arrest survivors. *Nitric Oxide.* 2012; 15; 26(4): 241–50.
  - 13) Rix PJ, Vick A, Attkins NJ, Barker GE, Bott AW, Alcorn H Jr, Gladwin MT, Shiva S, Bradley S, Hussaini A, Hoye WL, Parsley EL, Masamune H. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety, and tolerability of nebulized sodium nitrite (AIR001) following repeat-dose inhalation in healthy subjects. *Clin Pharmacokinet.* 2015; 54(3): 261–72.
  - 14) Tsuchiya K, Kanematsu Y, Yoshizumi M, Ohnishi H, Kirima K, Izawa Y, Shikishima M,

- Ishida T, Kondo S, Kagami S, Takiguchi Y, Tamaki T. Nitrite is an alternative source of NO in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005; 288(5): H2163-70.
- 15) Kitakaze M, Asanuma H, Takashima S, Minamino T, Ueda Y, Sakata Y, Asakura M, Sanada S, Kuzuya T, Hori M. nifedipine-induced coronary vasodilation in ischemic hearts is attributable to bradykinin- and NO-dependent mechanisms in dogs. *Circulation* 2000; 101: 311-317.
- 16) Brovkovych V, Kalinowski L, Muller-Peddinghaus R, Malinski T. Synergistic antihypertensive effects of nifedipine on endothelium. *Hypertension*. 2001; 37: 34-39.
- 17) Berkels R, Egink G, Marsen TA, Bartels H, Roesen R, Klaus W. Nifedipine Increases Endothelial Nitric Oxide Bioavailability by Antioxidative Mechanisms. *Hypertension*. 2001; 37: 240-245.
- 18) Ohtake K, Koga M, Uchida H, Sonoda K, Ito J, Uchida M, Natsume H, Kobayashi J. Oral nitrite ameliorates dextran sulfate sodium-induced acute experimental colitis in mice. *Nitric Oxide*. 2010; 1; 23(1): 65-73.
- 19) Minamiyama Y, Takemura S, Imaoka S, Funae Y, Tanimoto Y, Inoue M. Irreversible inhibition of cytochrome P450 by nitric oxide. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997; 283(3): 1479-85.
- 20) Lupo E, Locher R, Weisser B, and Vetter W. In vitro antioxidant activity of calcium antagonists against LDL oxidation compared with  $\alpha$ -tocopherol. *Biochemical and Biophys Res Commun*. 1994; 203: 1803-1808.
- 21) Yamato M, Shiba T, Ide T, Honda Y, Yamada K and Tsutsui H, nifedipine treatment reduces brain damage after transient focal ischemia, possibly through its antioxidative effects. *Hypertens Res*. 2011; 34, 840-845.
- 22) Berkels R, Egink G, Marsen TA, Bartels H, Roesen R, Klaus W. Nifedipine increases endothelial nitric oxide bioavailability by antioxidative mechanisms. *Hypertension*. 2001; 37 (2): 240-5.
- 23) Kukongviriyapan U, Kukongviriyapan V, Pannangpetch P, Donpunha W, Sripui J, Sae-Eaw A, Boonla O7. Mameo Pomace Extract Alleviates Hypertension and Oxidative Stress in Nitric Oxide Deficient Rats. *Nutrients*. 2015; 7(8): 6179-6194.
- 24) Brockhoff B, Schreckenber R, Forst S, Heger J, Bencsik P, Kiss K, Ferdinandy P, Schulz R, Schlüter KD. Effect of nitric oxide deficiency on the pulmonary PTHrP system. *J Cell Mol Med*. 2017; 21(1): 96-106.
- 25) Hu H, Chiamvimonvat N, Yamagishi T, Marban E. Direct inhibition of expressed cardiac L-type Ca<sup>2+</sup> channels by S-nitrosothiol nitric oxide donors. *Circ Res*. 1997; 81(5): 742-52.
- 26) D.L. Archer. Evidence that ingested nitrate and nitrite are beneficial to health. *J. Food Prot*. 2002; 65: 872-875.