

**В.Ф. Сагач, Л.Б. Доломан, А.В. Коцюрuba, О.М. Буханевіч,
Х.А. Курданов, І.А. Бесланєєв, С.А. Бекузарова**

Збільшений вміст стабільних метаболітів оксиду азоту в крові мешканців високогір'я

Изучали содержание оксида азота (NO) в крови жителей высокогорья (2200 м над уровнем моря), которое оценивали по концентрации его стабильных метаболитов нитрита (NO_2^-) и нитрата (NO_3^-). Концентрацию NO_2^- и NO_3^- определяли с помощью соответственно реактива Грисса и бруцинового реактива при использовании спектрофотометрического метода. Нами впервые показано, что у жителей высокогорья по сравнению с жителями равнины увеличена концентрация NO_2^- ($37 \pm 3,3$ против $28,5$ нмоль/мл $\pm 1,3$ нмоль/мл; $P < 0,05$) и NO_3^- (1362 ± 43 против 845 нмоль/мл ± 65 нмоль/мл; $P < 0,001$) в крови. Наиболее выраженным было повышение концентрации NO_2^- в эритроцитах (почти в 6 раз); содержание NO_3^- в эритроцитах оказалось увеличенным в 2,5 раза, тогда как в плазме крови концентрация этих стабильных метаболитов не изменялась (для NO_3^-) или даже несколько снижалась (для NO_2^-). Такое повышенное содержание стабильных метаболитов NO в крови у жителей высокогорья может объяснять выявленные нами ранее расширение вазодилаторного резерва и усиление насосной и сократительной функции сердца. Активация системы оксида азота в высокогорье является важным и, возможно, пусковым механизмом адаптации сердечно-сосудистой системы к гипоксии, позволяющим сохранить адекватную перфузию тканей и оптимальное снабжение организма кислородом при его сниженном парциальном давлении во вдыхаемом воздухе и, тем самым, предотвратить развитие заболеваний, обусловленных вазоспастическими процессами.

ВСТУП

Численними експериментальними дослідженнями *in vitro* та *in vivo* доведено, що гіпоксія стимулює синтез оксиду азоту (NO) – найпотужнішого з відомих ендогенних вазодилаторів – через активацію ферментативного та неферментативного шляхів його утворення в організмі людини та тварин, що призводить до компенсаторної системної вазодилатації для забезпечення адекватної перфузії тканин за умов нестачі кисню [10, 13, 19, 20]. При цьому NO здатний діяти як прямий вазодилатор, стимулюючи гуанілатциклазу і призводячи до розслаблення гладеньких м'язів внаслідок підвищення в них концентрації циклічного ГМФ, а також як непрямий вазодилатор, знижуючи продукцію вазоконстрикторних агентів [11] або викликаючи гіперполяризацію

клітин судинних гладеньких м'язів і, тим самим, зменшуючи їх чутливість до дії вазоконстрикторних агентів [9]. В експериментах на вівцях показано, що тривала високогірна гіпоксія викликає збільшення концентрації нітрату (одного із стабільних метаболітів NO) у плазмі крові [23]. На можливе збільшення продукції NO за умов високогірної гіпоксії також вказують дані про підвищення концентрації нітрату та нітриту у сечі людей, яким проводили лікування гіпертонії за допомогою тривалих інтервальних гіпоксичних тренувань [3]. Нещодавно антропологи та пульмонологи з університету Клівленда (штат Огайо) виявили, що у легенях мешканців гірських районів – тибетців і болівійців – міститься приблизно у два рази більше оксиду азоту, ніж у людей, які живуть на рівнині [7]. Вміст оксиду азоту в крові мешканців високогір'я

© В.Ф. Сагач, Л.Б. Доломан, А.В. Коцюрuba, О.М. Буханевіч,
Х.А. Курданов, І.А. Бесланєєв, С.А. Бекузарова

не вивчали. Мета нашого дослідження - порівняльна оцінка концентрації стабільних метаболітів оксиду азоту у крові мешканців рівнини та високогір'я.

МЕТОДИКА

Концентрацію стабільних метаболітів оксиду азоту – нітриту (NO_2^-) та нітрату (NO_3^-) – визначали у плазмі та еритроцитах крові 88 практично здорових мешканців високогір'я (с. Тегенеклі, с. Терскол, КБР, 2100-2200 м над рівнем моря) віком від 27 до 63 років (39 чоловіків і 49 жінок), які живуть у високогір'ї не менше ніж 10 років. Отримані результати порівнювали з даними 45 мешканців м. Києва віком від 25 до 60 років (18 чоловіків і 27 жінок). Перед взяттям крові проводили загальноклінічне обстеження та реєстрували електрокардіограму. Проби венозної крові для дослідження брали вранці натще в об'ємі не менше ніж 5 мл. Концентрацію NO_2^- визначали в безбілкових зразках плазми та еритроцитів за допомогою реактиву Гріса за методом Гріна [14] у власній модифікації [2]. Еритроцити виділяли центрифугуванням суміші крові та 5%-го цитрату натрію (4:1 об'єм/об'єм). Фракцію еритроцитів тричі відмивали у фізіологічному розчині. Реактив Гріса готували, змішуючи однакові об'єми 0,1%-го водного розчину нафтилетилендіамін гідрохлориду з 1%-им розчином сульфаніламіну в 5%-ій ортофосфорній кислоті безпосередньо перед визначенням. В аліквоті безбілкової проби визначали NO_2^- , додаваючи реактив Гріса у співвідношенні 1:1. Після перемішування визначали величину екстинкції на спектрофотометрі (СФ-4-А, Росія) при довжині хвилі 543 нм. Вміст NO_2^- розраховували за калібрувальною кривою, побудованою для стандартних розчинів натрій NO_2^- . Концентрацію NO_3^- визначали у безбілкових аліквотах проб плазми та еритроцитів за допомогою спектрофотометричного методу [18] у власній модифікації (замість стрихніну використовували його гідроксильоване похідне – 10,11-диметоксистрихнін (бруцин)). До 0,5 мл

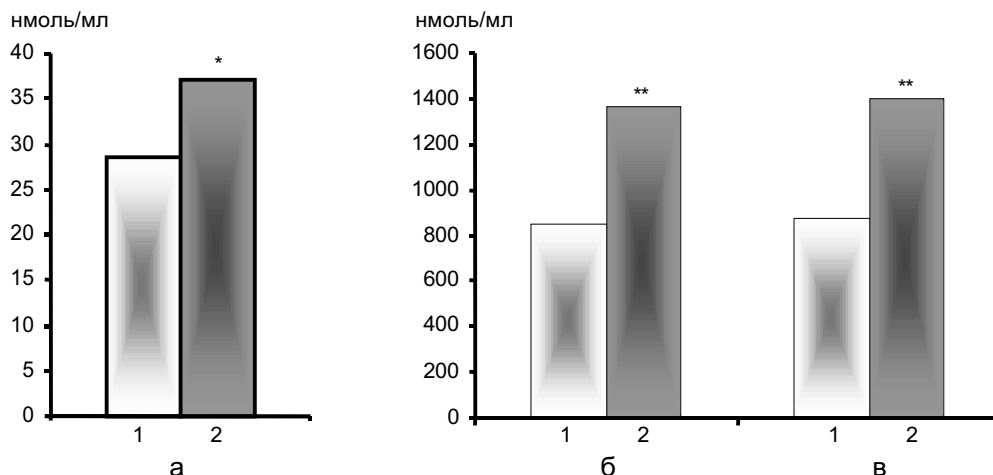
безбілкової проби додавали 1,5 мл бруцинового реактиву. До контрольних проб додавали 0,5 мл бідистильованої води. Проби інкубували протягом 10 хв на водяній бані при 100 °С. Після швидкого їх охолодження визначали екстинкцію при довжині хвилі 405 нм. Вміст NO_3^- розраховували за калібрувальною кривою, побудованою для стандартних розчинів натрій NO_3^- . Бруциновий реактив готували, розчиняючи 60 мг бруцину у 100 мл 48%-ої сірчаної кислоти.

Результати дослідження обробляли статистично з визначенням середнього арифметичного та стандартної похибки ($M \pm m$), а також довірчого інтервалу, що використовувався при оцінці ступеня достовірності розходжень (P) за допомогою критерію t Стьюдента. Розбіжності вважалися статистично достовірними при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Враховуючи взаємоперетворення NO_2^- і NO_3^- у біологічних середовищах організму, ми проаналізували сумарний вміст цих стабільних метаболітів NO у плазмі та еритроцитах крові. Після розрахунку загального вмісту NO_2^- і NO_3^- у крові виявилось, що у мешканців високогір'я він достовірно вищий, ніж у мешканців рівнини: концентрація NO_2^- вища на 29,8 %, NO_3^- - на 61,9 %, а загальний вміст NO_2^- і NO_3^- - на 60,2 % (рисунок).

При порівнянні концентрації NO_2^- і NO_3^- у плазмі та еритроцитах крові мешканців високогір'я та рівнини було виявлено цілу низку статистично достовірних розбіжностей. Як видно з даних, наведених у таблиці, у мешканців високогір'я порівняно з мешканцями рівнини вміст NO_2^- у плазмі крові був дещо зменшеним (на 38,3 %), а в еритроцитах – збільшеним майже в 6 разів. Збільшення концентрації NO_3^- (на 21,7 %) у плазмі крові мешканців високогір'я виявилось недостовірним, але в еритроцитах, знову-таки, спостерігалось значне підвищення вмісту NO_3^- (в 2,5 раза).



Загальний вміст стабільних метаболітів NO у крові мешканців рівнини (1) та високогір'я (2): а – NO_2^- , б – NO_3^- , в – $\text{NO}_2^+ + \text{NO}_3^-$.
* $P < 0,05$; ** $P < 0,001$.

Незмінна концентрація стабільних метаболітів NO в плазмі крові або її зменшення на фоні значного підвищення їх концентрації в еритроцитах може зумовлюватися перерозподілом аніонів нітриту та нітрату між цими двома компартментами крові.

Механізми виявленого нами збільшення концентрації стабільних метаболітів NO у крові мешканців високогір'я можуть бути різними. В експериментальних дослідженнях доведено, що гостра гіпоксія викликає в серці збільшення активності всіх 3-х ізоформ NO-синтази [6]. Активація конститутивних ізоформ NO-синтази при гіпоксії опосередкована збільшенням внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} внаслідок підвищення про-

никності кальцієвих каналів, при цьому внутрішньоклітинна концентрація Ca^{2+} тісно корелює з вивільненням ендотеліального NO [16, 17]. У свою чергу оксид азоту зменшує концентрацію Ca^{2+} у судинних гладеньких м'язах гальмуванням його вхідного потоку [8]. Експресію індукцибельної NO-синтази може викликати активація вільнорадикальних процесів внаслідок посилення синтезу цитокінів [21] і/або збільшення продукції супероксидрадикала [15].

Збільшення вмісту NO при гіпоксії може також відбуватися незалежно від NO-синтази – через його утворення з нітриту у ході нітритредуктазної реакції [5] або неферментативно – через відновлення нітриту у кислому середо-

Вміст стабільних метаболітів NO (нмоль/мл) у плазмі та еритроцитах крові мешканців високогір'я та рівнини

Показники	Нітрит (NO_2^-)	Нітрат (NO_3^-)
Плазма крові у мешканців		
рівнини	$24,8 \pm 1,1$	590 ± 68
високогір'я	$15,3 \pm 1,6$	718 ± 43
	$P < 0,001$	$P > 0,05$
Еритроцити у мешканців		
рівнини	$3,76 \pm 0,3$	255 ± 18
високогір'я	$21,6 \pm 3,2$	643 ± 42
	$P < 0,001$	$P < 0,001$

P - достовірність розбіжностей порівняно з показниками у мешканців рівнини

вищі та за наявності високих концентрацій відновних еквівалентів за умов гіпоксії [24]. Нітрит-аніон за цих умов може бути не продуктом окиснення оксиду азоту, а головним джерелом його утворення через ферментативне або неферментативне відновлення. Враховуючи отримане нами значне підвищення концентрації NO_2^- і NO_3^- саме в еритроцитах, ми вважаємо, що у мешканців високогір'я основною причиною збільшення вмісту цих метаболітів NO може бути активація як ферментативних, так і неферментативних шляхів їх утворення. Відомо, що при гіпоксії збільшується кількість еритроцитів, які є основним місцем ферментативного відновлення нітрит-аніона в крові. Цей процес відбувається за дії дезоксигемоглобіну, що виступає як нітритредуктаза і активується при гіпоксії, оскільки кисень є інгібітором нітритредуктазної активності гемоглобіну [4]. Збільшення концентрації NO_3^- в еритроцитах може бути зумовлено посиленням при гіпоксії ферментативного окислення NO до нітрат-аніона. Ще однією причиною підвищення концентрації NO_3^- при хронічній гіпоксії може бути активація його неферментативного утворення при розпаді пероксинітриду за умов ацидозу. Останній шлях видається тим більш імовірним, що за умов гіпоксії підвищується не лише концентрація іонів водню, а й генерація супероксид-аніона в еритроцитах.

Активація NO-залежних механізмів адаптації до гіпоксії відбувається досить швидко. За деякими даними, у процесі адаптації у кровноносних судинах збільшується експресія гену NO-синтази [22]. Попередні результати наших досліджень вказують на те, що система оксиду азоту за умов високогір'я активується дуже швидко, і, можливо, це є одним із перших механізмів адаптації серцево-судинної системи до гіпоксії.

Виявлений у мешканців високогір'я збільшений вміст стабільних метаболітів NO у крові може пояснювати розширення вазодилататорного резерву та посилення насосної й скоротливої функції серця, які ми спостерігали раніше [1]. Таким збільшенням про-

дукції та/або вивільнення NO може також пояснюватися менша поширеність артеріальної гіпертонії серед мешканців високогір'я та відсутність характерного для рівнини вікового підвищення артеріального тиску [12]. Активація NO-залежних механізмів адаптації до гіпоксії може викликати не тільки антигіпертензивний ефект, але й обмежувати фактори ризику розвитку ішемічної хвороби серця, гальмувати утворення атеросклеротичних та діабетичних судинних уражень, тобто попереджувати або затримувати розвиток патологічних станів, що супроводжуються дисфункцією ендотелію і нестачею NO.

ВИСНОВКИ

1. У мешканців високогір'я внаслідок дії помірної гіпоксії збільшується концентрація стабільних метаболітів оксиду азоту в крові.

2. У людей, які живуть у високогір'ї, найбільш виразним виявилось підвищення концентрації NO_2^- і NO_3^- в еритроцитах (майже в 6 разів і в 2,5 раза відповідно), тоді як у плазмі крові концентрація цих стабільних метаболітів не відрізнялась (для NO_3^-) або була навіть дещо меншою (для NO_2^-) порівняно з відповідними показниками у мешканців рівнини. Така значна різниця між концентрацією стабільних метаболітів NO в плазмі крові та еритроцитах зумовлюється можливим перерозподілом аніонів нітриду та нітрату між цими двома компартментами крові.

3. Активація системи оксиду азоту може бути одним із перших механізмів адаптації серцево-судинної системи до дії високогірної гіпоксії, спрямованих на подолання вазоконстрикції, забезпечення адекватної перфузії тканин, оптимального постачання організму киснем і попередження розвитку захворювань, зумовлених вазоспастичними процесами.

V.F. Sagach¹, L.B. Doloman¹,
A.V. Kotsuruba², O.M. Buhanevich², H.A.
Kurdanov³, I.A. Beslaneev³, S.A. Bekuzarova³

INCREASED NITRIC OXIDE STABLE METABOLITES BLOOD LEVEL IN HIGHLANDERS

The investigation was designed to study nitric oxide (NO) blood level estimated by measuring its stable metabolites nitrite (NO₂⁻) and nitrate (NO₃⁻) concentration in highlanders (2,200 m a.s.l.). NO₂⁻ and NO₃⁻ concentration was measured with Griss reagent and brucine reagent respectively with using the spectrophotometric method. We first found that highlanders compared to lowlanders have increased blood level of NO₂⁻ (37 ± 3.3 nmol/ml vs. 28.5 ± 1.3 nmol/ml, P < 0.05) and NO₃⁻ (1362 ± 43 nmol/ml vs. 845 ± 65 nmol/ml, P < 0.001). As the most significant, there was increase in NO₂⁻ concentration in erythrocytes (by about 6 times), NO₃⁻ level in erythrocytes was revealed to be increased by 2.5 times, whereas the plasma concentration of these stable metabolites was the same (for NO₃⁻) or even slightly decreased (for NO₂⁻). Such increased NO stable metabolites blood level in highlanders may explain widening of vasodilative reserve and strengthening of cardiac pump and contractile functions, which we revealed previously. Activation of NO-system in high altitude is important and probable trigger adaptive mechanism of cardiovascular system to hypoxia. This mechanism allows to retain adequate tissue perfusion and optimal oxygen supply in its decreased partial pressure in inhaled air and thereby to prevent diseases caused by vasospastic processes.

¹A. A. Bogomoletz Institute of Physiology NASU,
Kiev, Ukraine doloman@serv.biph.kiev.ua

²A.V. Palladin Institute of Biochemistry NASU,
Kiev, Ukraine

³International Centre for Astronomical, Medical
and Ecological Research NASU, RAS
and government of KBR, Terskol, Russia

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Долман Л.Б., Сагач В.Ф., Курданов Х.А. та ін. Особливості кардіогемодинаміки та ендотеліязалежної судинної реактивності у мешканців високогір'я // *Фізіол. журн.* – 2002. – **48**, №4. – С. 33–38.
2. Коцюрба А.В., Семикопна Т.В., Вікторов О.П. та ін. Деклараційний патент на винахід 31600 А. 15.12.2000. – Бюл. №7–11. Спосіб кількісного визначенні нітрит–аніону в біологічній рідині.
3. Лямина Н.П., Сенчихин В.Н., Покидьшев Д.А., Манухина Е.Б. Нарушение продукции оксида азота у мужчин молодого возраста с артериальной гипертензией и немедикаментозный метод ее коррекции // *Кардиология.* – 2001. – **41**, №9. – С. 17–21.
4. Реутов В.П., Ажипа Я.И., Каюшин Л.П. Кислород как ингибитор нитритредуктазной активности гемоглобина // *Докл. РАН. Серия биол.* – 1983. – №3. – С. 408–417.
5. Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Охотин В.Е., Косицын Н.С. Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих. – М.: Наука, 1998. – 159 с.
6. Baker J.E., Holman P., Kalyanaraman B. et al. Adaptation of hearts to chronic hypoxia increases tolerance to subsequent ischemia by increased nitric oxide production // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 1998. – **454**. – P. 203–217.
7. Beall C.M., Laskowski D., Strohl K.P. et al. Pulmonary nitric oxide in mountain dwellers // *Nature.* – 2001. – **414**, N6862. – P411–412.
8. Blatter L., Wier W. Nitric oxide decreases [Ca²⁺] in vascular smooth muscle by inhibition of the calcium current // *Cell Calcium.* – 1994. – **15**. – P.122–131
9. Earley S., Naik J.S., Walker B.R. 48-h Hypoxic exposure results in endothelium-dependent systemic vascular smooth muscle cell hyperpolarization // *Amer. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* – 2002. – **283**, N1. – P. R79–85.
10. Ishimura N., Kitaguchi K., Tatsumi K., Furuya H. Nitric oxide involvement in hypoxic dilatation of pial arteries in the cat // *Anesthesiology.* – 1996. – **85**, №6. – P.1350–1356.
11. Faller DV Endothelial cell responses to hypoxic stress // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* – 1999. – **26**, N1. – P. 74–84.
12. Fiori G., Facchini F., Pettener D. et al. Relationships between blood pressure, anthropometric characteristics and blood lipids in high- and low-altitude populations from Central Asia // *Ann. Hum. Biol.* – 2000. – **27**, N1. – P 19–28.
13. Giordano E., Guarnieri C., Muscari C., Caldarera C.M. Molecular mechanisms of response to low oxygen tension in the vascular wall // *Cardiology.* – 1999. – **44**, N9. – P.779–782.
14. Green L.C., David A.V., Glogowski J. et al. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids // *Ann. Biochem.* – 1982. – **126**, N1. – P. 131–138.
15. Kuo P.C., Abe K., Schroeder R.A. Superoxide enhances interleukin 1 beta – mediated transcription of the hepatocyte-inducible nitric oxide synthase gene // *Gastroenterology.* – 2000. – **118**, N3. – P.608–618.

16. Mulsch A., Bassenge E., Busse R. Nitric oxide synthesis in endothelial cytosol: evidence for a calcium-dependent and a calcium-independent mechanism // Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. – 1989. – **340**, N6(Pt 2). – P. 767–770.
17. Ochiai-Kanai R., Hasegawa K., Takeuchi Y. et al. Immunohistochemical nitrotyrosine distribution in neonatal rat cerebrocortical slices during and after hypoxia // Brain Res. – 1999. – **847**, N1. – P. 59–70.
18. Schmidt H.H.W. Determination of NO via measurement of nitrite and nitrate in culture media // Biochemica. – 1995. – **2**. – P. 22–34.
19. Siegel G., Grote J., Schnalke F., Zimmer K. The significance of the endothelium for hypoxic vasodilation // Z. Kardiol. – 1989. – **78**, N6. – P. 124–131.
20. Vallet B., Winn M.J., Asante N.K., Cain S.M. Influence of oxygen on endothelium-derived relaxation factor / nitric oxide and K⁺-dependent regulation of vascular tone // J. Cardiovasc. Pharmacol. – 1994. – **24**, N4. – P. 596–602.
21. West M.A., Li M.H., Seatter S.C. Bubrick M.P. Pre-exposure to hypoxia or septic stimuli differentially regulates endotoxin release of tumor necrosis factor, interleukin-6, interleukin-1, prostaglandin E2, nitric oxide, and superoxide by macrophages // J. Trauma. – 1994. – **37**, N1. – P. 82–89.
22. Xue C., Rengasamy A., Le Cras T.D. et al. Distribution of NOS in normoxic vs. hypoxic rat lung: upregulation of NOS by chronic hypoxia // Amer. J. Physiol. – 1994. – **267**, N6 (Pt1). – P. L667–L678.
23. Zhang L., Xiao D., Bouslough DB. Long-term high-altitude hypoxia increases plasma nitrate levels in pregnant ewes and their fetuses // Amer. J. Obstet. Gynecol. – 1998. – **179**, N6 (Pt 1). – P. 1594–1598.
24. Zweier J.L., Samouilov A., Kuppusamy P. Non-enzymatic nitric oxide synthesis in biological systems // J. Biochem. And Biophys. Acta. – 1999. – **1411**, N 2–3. – P. 250–262.

*Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН
України, Київ;*

*Ин-т біохімії ім. О.В. Палладіна НАН
України, Київ;*

*Міжнарод. центр астроном. і мед.-екол.
досліджень, Терскол, КБР, Росія*

*Матеріал надійшов до
редакції 20.08.2002*