© Г.Т. Иванова, Г.И. Лобов, О.Н. Береснева, М.М. Парастаева, 2019
УДК [612.181 : 612.46]-092.4

Г.Т. Иванова[1], Г.И. Лобов[1], О.Н. Береснева[2,], М.М. Парастаева[2]*

ИЗМЕНЕНИЕ РЕАКТИВНОСТИ СОСУДОВ КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ УМЕНЬШЕНИЕМ МАССЫ ФУНКЦИОНИРУЮЩИХ НЕФРОНОВ

[1] Лаборатория физиологии сердечно-сосудистой и лимфатической систем, Институт физиологии им. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия, [2] лаборатория клинической физиологии почек, Научно-исследовательский институт нефрологии, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

РЕФЕРАТ

ЦЕЛЬ: оценить изменения эндотелийзависимой регуляции тонуса кровеносных сосудов (аорты и верхней брыжеечной артерии) у крыс через 4 месяца после удаления 5/6 почечной ткани. *МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ*. Модель ХБП создавали резекцией 5/6 массы почечной ткани. В экспериментальную группу вошли животные (n=12), подвергнутые нефрэктомии (НЭ). Контрольную группу составили ложнооперированные (ЛО) крысы (n=10). Исследования реактивности сосудов проводили на кольцевых сегментах длиной 2 мм, которые вырезали из аорты и верхней брыжеечной артерии (ВБА). Всего было подготовлено 23 сегмента аорты и 17 сегментов ВБА от крыс после НЭ и 18 сегментов аорты и 15 сегментов ВБА от контрольных животных. Для измерения силы сокращений препаратов использовали датчик FORT-10 (WPI, USA). Оценивали амплитуду ответов сосудов, предварительно сокращенных фенилэфрином (1×10^{-5} М), на ацетилхолин (АХ, 1×10^{-6} М), а также реакцию на АХ в условиях предварительного воздействия ТЭА (1×10^{-3} М) и L-NAME (1×10^{-4} М). *РЕЗУЛЬТАТЫ*. Через 4 месяца после резекции части почечной ткани у крыс развивались артериальная гипертензия – АД в группе НЭ крыс было выше (165, 0±9,8 мм рт.ст) по сравнению с ЛО (127,2±9,7 мм рт. ст., $p<0,001$), и ремоделирование миокарда (ИММЛЖ у НЭ крыс составлял 2,72±0,11 мг/г по сравнению с 2,35±0,09 мг/ в ЛО группе, $p<0,001$). НЭ также приводила к уменьшению дилатация фрагментов аорты и ВБА на АХ по сравнению с ЛО животными. В условиях блокады синтеза NO ингибитором NO- синтазы – L-NAME реакция на АХ также была ниже у крыс с НЭ. Предварительная блокада Ca2+-активируемых K+-каналов большой проводимости введением ТЭА приводила к снижению вазодилатации, вызванной АХ, у НЭ крыс по сравнению с ЛО группой. *ЗАКЛЮЧЕНИЕ*. Резекция 5/6 массы ткани почек у крыс вызывает снижение реактивности сосудов на АХ. Дисрегуляция тонуса сосудов связана с нарушением продукции/биодоступности NO, синтезируемого эндотелием и ингибированием механизма эндотелиальной гиперполяризации.

Ключевые слова: сердечно-сосудистая система, нефрэктомия, аорта, верхняя брыжеечная артерия, эндотелиальная дисфункция, крысы

G.T. Ivanova[1], G.I. Lobov[1], O.N. Beresneva[2,], M.M. Parastaeva[2]*

CHANGES IN THE REACTIVITY OF VESSELS OF RATS WITH AN EXPERIMENTAL DECREASE IN THE MASS OF FUNCTIONING NEPHRONS

[1] Laboratory of physiology of the cardiovascular and lymphatic systems. I.P. Pavlov Institute of Physiology, Saint-Petersburg, Russia, [2] Laboratory of Clinical Physiology of the Kidney, Institute of Nephrology, First Pavlov St.-Petersburg State Medical University, St.-Petersburg, Russia

ABSTRACT

THE AIM: to evaluate changes in endothelium-dependent regulation of the tone of blood vessels (aorta and superior mesenteric artery) in rats 4 months after the removal of 5/6 renal tissue. *MATERIAL AND METHODS*. An experimental CKD model was created by resection of 5/6 mass of renal tissue. The experimental group included animals (n = 12), subjected to nephrectomy (NE). The control group consisted of sham-operated (SO) rats (n = 10). Researches of vascular reactivity were performed on ring segments 2 mm long, which were excised from the aorta and superior mesenteric artery (SMA). A total of 23 segments of the aorta and 17 segments of SMA from rats after NE and 18 segments of the aorta and 15 segments of SMA from control animals were prepared. To measure the strength of contractions of the drugs, a FORT-10 sensor (WPI, USA) was used. The effects of acetylcholine (Ach, 1×10^{-6} M) on blood vessels, previously exposed to phenylephrine (1×10^{-5} M), and the response of vessels to Ach under conditions of prior exposure to TEA (1×10^{-3} mol / l) and L-NAME (1×10^{-4} mol / l) were evaluated. *RESULTS*. NE for a period of 4 months led to arterial hypertension – BP in the NE group of rats was higher (165, 0 ± 9.8 mm Hg) compared with SO (127.2 ± 9.7 mm Hg, $p<0,001$), and to myocardial remodeling (LVMI in NE rat was 2.72 ± 0.11 mg / g compared to 2.35 ± 0.09 mg / in the SO group, $p<0,001$). NE led to a decrease in dilatation of aortic and BWA fragments on the ACh compared with LO animals. Under the conditions of NO blocking, the NO synthase inhibitor — L-NAME — also had a lower response to ACh in rats with NE. The preliminary blockade of the Ca2 + -activated K + channels of high conductivity with the introduction of TEA resulted in a decrease in vasodilation caused by ACh in NE rat compared with the SO group. *CONCLUSION*. Resection of 5/6 of the kidney tissue mass in rats

*Береснева О.Н. 197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого, д. 17, корп. 54. Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Научно-исследовательский институт нефрологии, лаборатория клинической физиологии почек. Тел.: (812) 346-39-26, E-mail beresnevaolga@list.ru. ORCID: 0000-0002-7532-2405

causes a decrease in vascular reactivity on the ACh. Endothelial dysfunction of rats after NE is associated with impairment of both NO-related and hyperpolarization-dependent endothelial cells in pathways of the vascular tone regulation.

Keywords: cardiovascular system, nephrectomy, aorta, superior mesenteric artery, endothelial dysfunction, rats

Для цитирования: Иванова Г.Т., Лобов Г.И., Береснева О.Н.*, Парастаева М.М. Изменение реактивности сосудов крыс с экспериментальным уменьшением массы функционирующих нефронов. Нефрология 2019; 23 (4): 88-95. doi:10.24884/1561-6274-2019-23-4-88-95
For citation: Ivanova G.T., Lobov G.I., Beresneva O.N., Parastaeva M.M. Changes in the reactivity of vessels of rats with an experimental decrease in the mass of functioning nephrons. Nephrology (Saint-Petersburg) 2019; 23 (4): 88-95 (In Rus.). doi:10.24884/1561-6274-2019-23-4-88-95

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время известно, что сердечно-сосудистая система и почки являются настолько функционально связанными, что принято говорить о существовании кардиоренального континуума [1], частными проявлениями которого могут считаться кардиоренальные синдромы [2]. У пациентов с патологией почек (хроническая болезнь почек – ХБП) отмечается повышенный риск кардиоваскулярной заболеваемости и смертности [1, 3, 4, 5]. При этом ХБП рассматривается в качестве независимого фактора риска сердечно-сосудистых осложнений даже при умеренном снижении массы действующих нефронов (ранние стадии ХБП) [4, 5]. Среди больных ХБП риск сердечно-сосудистой смертности в 10-100 раз больше, чем у здоровых лиц [3].

При этом коронарная патология (коронарная болезнь сердца – КБС) является одной из основных причин смерти у пациентов с ХБП, а выживаемость больных с хронической почечной дисфункцией, подвергшихся коронарной реваскуляризации, хуже, чем при отсутствии повреждений почек. Частота и тяжесть обструктивных вариантов КБС нарастают по мере снижения скорости клубочковой фильтрации (СКФ). КБС при ХБП характеризуется диффузным вовлечением многих сосудов и их кальцификацией [6, 7].

Показано, что при ХБП риск смерти от сердечно-сосудистых осложнений увеличивается вследствие ускоренного развития атеросклероза, повышенной жесткости артерий и дисфункции эндотелия. Padberg и соавт. также выявили, что ХБП связана с повреждением эндотелиального гликокаликса (ЭГ), которое выражается в уменьшении толщины ЭГ и повышением в крови содержания продуктов распада ЭГ [8]. В свою очередь артериальная гипертензия (АГ) и гипертрофия левого желудочка у пациентов с ХБП считаются важными факторами кардиоваскулярного риска [9, 10]. Однако традиционные факторы сердечно-сосудистого риска, такие как АГ, гиперлипидемия и сахарный диабет, не полностью объясняют высокие кардиоваскулярную заболеваемость и смертность в условиях уменьшения количества функционирующих нефронов [11, 12]. Несмотря на то, что существует четкая обратно пропорциональная зависимость между снижением скорости клубочковой фильтрации (СКФ) и сердечно-сосудистой заболеваемостью, механизмы, которые приводят к росту летальных случаев от сердечно-сосудистых осложнений при дисфункции почек, остаются недостаточно изученными [12]. До сих пор нет единого мнения и о механизмах регуляции сосудистого тонуса при ХБП. Ответы на эти вопросы необходимы как для выработки адекватных методов коррекции сердечно-сосудистых осложнений при нарушении функции почек, так и для подбора превентивных мер, позволяющих предупредить или снизить негативное влияние почечной патологии на миокард и сосуды.

Более ясную картину может дать использование различных экспериментальных моделей, в том числе основанных на уменьшении массы функционирующей паренхимы почек. Однако большинство исследований состояния сердца и сосудов на таких моделях выполнено через сравнительно короткие сроки после индукции почечной недостаточности (2 мес. или менее). В связи этим мы сочли целесообразным оценить изменения эндотелийзависимой регуляции тонуса кровеносных сосудов (аорты и верхней брыжеечной артерии) у крыс через 4 мес после удаления 5/6 почечной ткани (5/6 НЭ), учитывая, что данный срок продолжительности жизни крысы эквивалентен 10–12 годам продолжительности жизни человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проведены на 22 крысах, самцах стока Wistar (масса 200–250 г) из биоколлекции лабораторных животных Института физиологии им. И.П. Павлова РАН**.** Исследование было одобрено этическим комитетом Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. Животные содержались в условиях вивария, получали стандартный пищевой рацион и питьевую воду ad libitum.

Крысы были разделены на две группы. В первую группу вошли животные (n=12), подвергнутые резекции 5/6 массы ткани почек (НЭ). Вторую (контрольную) группу составили ложнооперированные (ЛО) крысы (n=10).

Экспериментальную модель ХБП создавали за счет резекции 5/6 массы почечной ткани. Опера-

цию проводили под наркозом в два этапа с интервалом в одну неделю. В качестве наркоза (внутримышечное введение) использовали ксилазин (0,05 мл) в сочетании с тилетамин/золазепамом (0,3 мл). На первом этапе удаляли 2/3 массы левой почки. На втором – полностью удаляли контрлатеральную правую почку. Для доступа к почкам использовали заднепоясничный разрез. С целью сохранения надпочечников почки перед резекцией декапсулировали. Контрольным животным «ложную» операцию также выполняли в два этапа с интервалом в одну неделю: операционную рану почки извлекали на 4–5 минут и без нефрэктомии помещали обратно. Такая модель до настоящего времени является «золотым стандартом» для изучения самых разных аспектов хронической болезни почек (ХБП) [13–17]. После поэтапной резекции почечной ткани дальнейшее длительное существование организма в условиях резкого сокращения массы действующих нефронов сопровождается развитием гемодинамических, метаболических и иммунных сдвигов (системная и гломерулярная гипертензия, нарушения липидного обмена или кальций-фосфорного гомеостаза, хроническое воспаление и т.д.), почти идентичных появляющимся при прогрессировании ХБП у человека. В силу всего изложенного выше мы сочли модель 5/6 НЭ полностью соответствующей целям нашего исследования.

Срок наблюдения после оперативного вмешательства составлял 16 недель. По истечению этого срока у бодрствующих крыс проводили измерение систолического артериального давления (АД) манжеточным методом на хвосте, используя электроманометр фирмы ELEMA (Швеция), а также определяли частоту сердечных сокращений (ЧСС) за 1 минуту. Для каждой крысы выполняли 4–5 замеров АД и рассчитывали среднее значение трех последних измерений.

Эвтаназию животных осуществляли посредством декапитации, во время которой отбирались образцы крови для последующего анализа. В сыворотке крови определяли уровень мочевины (ммоль/л) на автоанализаторе «Cobas E Mira».

После декапитации у крыс иссекали грудную аорту и верхнюю брыжеечную артерию (ВБА) и помещали в охлажденный до +2 – +4 °С физиологический раствор, в котором они хранились до момента исследования. Исследования проводили на сегментах сосудов длиной 2 мм, которые вырезали из аорты и ВБА, предварительно очищенных от жира и соединительной ткани.

Всего было подготовлено 23 сегмента аорты и 17 сегментов ВБА от крыс с нефрэктомией и 18 сегментов аорты и 15 сегментов ВБА от контрольных животных. Подготовленные сосудистые препараты помещали в термостатируемую (+37,0±0,1 °С) камеру миографа с проточным физиологическим солевым раствором следующего состава (ммоль/л): NaCl – 120,4; KCl – 5,9; $CaCl_2$ – 2,5; $MgCl_2$ – 1,2; NaH_2PO_4 – 1,2; $NaHCO_3$ – 15,5; глюкоза – 11,5. Физиологический раствор сатурировали газовой смесью, состоящей из 95 % O_2 и 5 % CO_2. Для измерения силы сокращений препаратов использовали датчик FORT-10 (WPI, USA). Препараты подвергали исходному натяжению, соответствующему трансмуральному давлению 90 мм рт. ст. и после 30-минутной стабилизации регистрировали параметры их сократительной активности. Подробно методика эксперимента описана ранее [18].

В исследовании использовали: ацетилхолин (Acetylcholine chloride, Sigma-Aldrich) 1×10^{-10} – 1×10^{-4} М; L-NAME (N_ω-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride, ICN Biomedicals) 1×10^{-4} М; тетраэтиламмоний (Tetraethylammonium chloride, Sigma-Aldrich), 1×10^{-3} М; фенилэфрин (Phenylephrine, Sigma-Aldrich), 1×10^{-6} М.

После выведения из эксперимента у крыс также выделяли и взвешивали сердце. По результатам измерений рассчитывали индекс массы миокарда левого желудочка (ИММЛЖ), равный отношению: масса миокарда левого желудочка/ масса животного (мг/г).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программы «StatSoft STATISTICA 6.1.478». Поскольку полученные данные имели нормальное распределение, они представлены в виде средних значений со стандартной ошибкой средней (M±SE). Для установления достоверности различий использовали t-критерий Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p<0,05$.

Исследования проведены в соответствии с Национальным стандартом Российской федерации ГОСТ 3-53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики», Приказом Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики» при одобрении Этическим комитетом Института физиологии им. Павлова РАН.

РЕЗУЛЬТАТЫ

НЭ у крыс приводила к прогрессивному нарастанию азотемии. Так, через 4 месяца после резекции почечной ткани содержание мочевины в сыворотке крови у крыс увеличивалось в среднем до 20,1±2,6 ммоль/л по сравнению с контрольны-

ми животными (4,9±0,6 ммоль/л, p <0,001). Уменьшение массы функционирующих нефронов у крыс сопровождалась развитием гипертензии: прирост систолического АД составлял в среднем 30 % от исходного уровня, достигая 165, 0±9,8 мм рт. ст. (по сравнению с 127,2±9,7 мм рт. ст. в группе ЛО животных, p <0,01). Однако при этом значимые различия частоты сердечных сокращений у крыс с НЭ (415±33 уд/мин) и животных ЛО группы (380±19 уд/мин, p>0,05) отсутствовали. В то же время ИММЛЖ у крыс через 4 месяца после НЭ был значительно выше, чем в ЛО группе (в среднем 2,72±0,11 мг/г и 2,35±0,09 мг/г соответственно, p<0.001). Таким образом, НЭ приводила к нарушениям функционирования сердечно-сосудистой системы, выраженным в развитии вторичной ренальной артериальной гипертензии и активизации процессов ремоделирования миокарда.

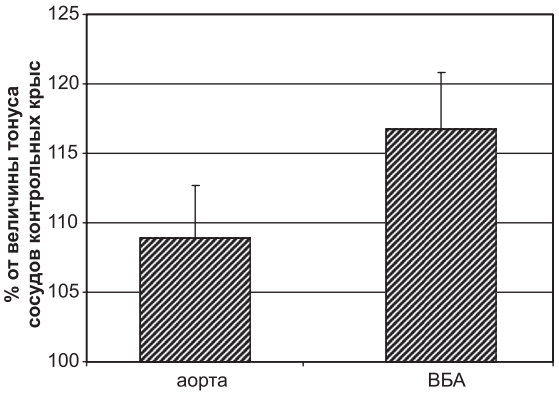

Рис. 1. Величина тонуса сегментов аорты и верхней брыжеечной артерии крыс после нефрэктомии, выраженная в процентах от исходного тонуса контрольных животных.
Figure 1. The magnitude of the tone of the segments of the aorta and superior mesenteric artery of rats after nephrectomy, expressed as a percentage of the initial tone of the control animals.

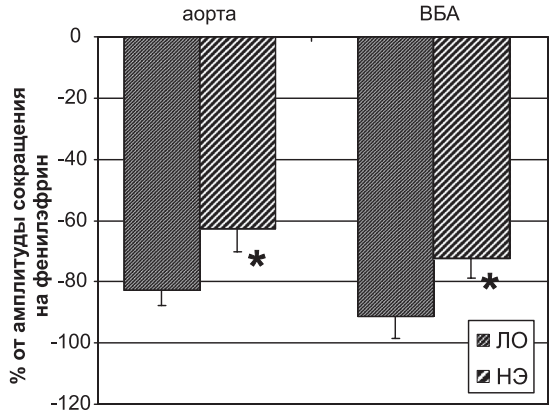

Рис. 2. Влияние ацетилхолина (1×10^{-6} М) на тонус аорты и верхней брыжеечной артерии, предварительно сокращенных фенилэфрином (1×10^{-5} М), у крыс после нефрэктомии (НЭ) и контрольных крыс (ЛО). * – p<0,001.
Figure 2. Effect of acetylcholine (1×10^{-6} M) on the tone of the aorta and superior mesenteric artery, previously contracted with phenylephrine (1×10^{-5} M), in rats after nephrectomy (NE) and control rats (LO). * – p <0,001.

Для оценки реактивности сосудов измерение исходного тонуса сосудистых сегментов начинали с 30-й минуты эксперимента, когда наступала его стабилизация после размещения фрагмента сосуда в камере установки. Сегменты аорты и верхней брыжеечной артерии НЭ животных в стандартных условиях демонстрировали более высокий уровень тонического напряжения по сравнению с препаратами, полученными от контрольных крыс. В наших исследованиях исходный тонус интактных (с сохраненным эндотелиальным слоем) сегментов аорт в ЛО группе составил 262±24 мг, ВБА – 233±20 мг. Уменьшение количества функционирующих нефронов на данных сроках наблюдения приводило к увеличению исходного тонуса как аорты, так и ВБА (рис.1).

Для изучения механизмов регуляции тонуса сосудов у животных, подвергнутых резекции почечной ткани, использовали оценку степени вазодилатации исследуемых фрагментов сосудов при введении в омывающий раствор ацетилхолина (АХ). В предыдущих работах было показано, что реакция аорты и брыжеечной артерии на АХ при исходном тонусе имеет небольшую амплитуду (18). Поэтому исследования принято проводить в условиях предварительной констрикции сосудов, воздействуя на них до начала тестирования фенилэфрином. Добавление в физиологический раствор фенилэфрина в концентрации 1×10^{-6} М приводило к сокращению ГМК сосудов, о котором судили по повышению уровня тонического напряжения сосудистого фрагмента. Последующую оценку вазодилататорного действия АХ проводили только после стабилизации тонуса фрагментов сосудов на новом уровне.

Введение в раствор АХ в концентрации 1×10^{-6} М приводило к выраженной вазодилатации фрагмента аорты крыс обеих групп (рис. 2). Однако вызванная АХ дилатация аорты крыс, подвергнутых НЭ, оказалась меньшей, чем у контрольных ЛО животных. Таким образом, уменьшение массы функционирующих нефронов приводило к значимому снижению ответной реакции сегмента аорты на воздействие АХ.

Аналогичная закономерность наблюдалась и в исследовании действия АХ на верхнюю брыжеечную артерию (рис. 2). Следует отметить, что реакция на АХ сегментов ВБА, выраженная в процентах от амплитуды их сокращения на фенилэфрин, была большей, чем ответ аорты, как у крыс с НЭ, так и у ЛО животных.

Для уточнения механизмов влияния НЭ на эндотелийзависимую регуляцию тонуса сосудов, в частности, определения роли NO, в физиологиче-

ский раствор сначала вводили ингибитор синтазы NO – L-NAME, а затем фенилэфрин и АХ. В таких условиях АХ также оказывал вазодилататорное действие на аорту и ВБА, однако выраженность дилатации была меньше, чем в исследовании с сохранением синтеза NO (рис. 3). Следует отметить, что в исследованиях этой серии снижение вызванной АХ вазодилатации как аорты, так и ВБА у крыс с НЭ было менее выражено, чем у контрольных ЛО животных. В то же время снижение ответа сосудов животных, подвергнутых резекции части почечной паренхимы на введение АХ в раствор, было большим у фрагментов аорты (в 1,9 раза по сравнению с ЛО группой), чем у ВБА (1,4 раза). Таким образом, уменьшение ответа сосудистых фрагментов крыс с НЭ на АХ при ингибировании синтеза NO по сравнению с ЛО группой указывает на нарушение продукции NO эндотелием сосудов животных данной экспериментальной группы.

Для уточнения роли эндотелиальной гиперполяризации в реакции сосудов на АХ при развитии уремии использовали блокаду Ca^{2+}-активируемых K^+-каналов большой проводимости введением в раствор ТЭА (1×10^{-6} М). В этих условиях АХ вызывал вазодилатацию предварительно сокращенных фенилэфрином сосудов (рис. 4) как в группе животных после НЭ, так и у контрольных крыс. Однако величина ответа была различной. У крыс, подвергнутых уменьшению количества функционирующих нефронов, регистрировалось значимое снижение вазодилататорного ответа сосудов (по сравнению с ЛО животными), более выраженное у фрагментов ВБА, чем аорты. Таким образом, наше исследование показало участие механизмов, связанных с гиперполяризацией мембраны, в регуляции ответа сосудов крыс на АХ. Нарастание азотемии приводит к снижению роли гиперполяризации мембраны в процессах вазодилятации сосудов, предварительно сокращенных фенилэфрином, в ответ на воздействие АХ.

Таким образом, экспериментальное уменьшение количества функционирующих нефронов на длительных сроках наблюдения (4 месяца после НЭ) приводит к снижению вызванной АХ релаксации фрагментов аорты и ВБА, предварительно сокращенных фенилэфрином. Выявлено также снижение роли NO и гиперполяризации мембраны в процессах вазорелаксации у крыс после НЭ.

ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно полученным в настоящем исследовании данным, сокращение массы паренхимы почек у экспериментальных животных приводит к развитию закономерных функциональных и метаболических проявлений ХБП. Так, через 4 месяца после НЭ у крыс происходит нарастание уровня мочевины крови. Азотемия сопровождается ростом артериального давления и массы миокарда. Это указывает на негативное влияние ХБП на сердечно-сосудистую систему. Патологическое влияние НЭ на функционирование сосудов подтверждается также результатами наших экспериментов, выполненных на фрагментах аорты и ВБА, которые показали снижение регуляторных возможностей исследуемых сосудов после уменьшения количества функционирующих нефронов. Механизмы

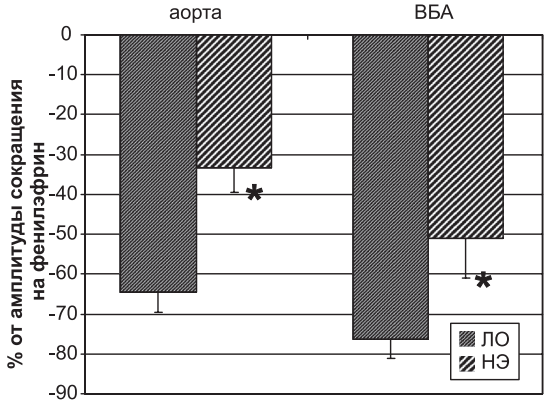

Рис. 3. Влияние ацетилхолина (1×10^{-6} М) на тонус фрагментов аорты и ВБА после блокады синтеза NO (L-NAME, неселективный ингибитор синтазы оксида азота, 1×10^{-4} М), сокращенных фенилэфрином (1×10^{-5} М), у крыс после нефрэктомии (НЭ) и контрольных крыс (ЛО). * – p<0,001.

Figure 3. Effect of acetylcholine (1×10^{-6} M) on the tone of aortic fragments and BWA after blockade of NO synthesis (L-NAME, non-selective inhibitor of nitric oxide synthase, 1×10^{-4} M), reduced by phenylephrine (1×10^{-5} M), in rats after nephrectomy (NE) and control rats (LO). * – p <0,001.

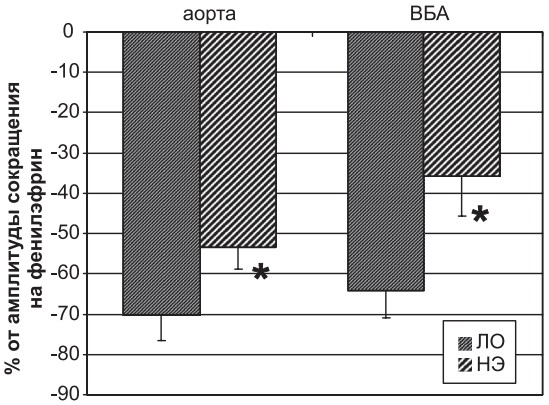

Рис. 4. Влияние ацетилхолина (1×10^{-6} М) на тонус фрагментов аорты и ВБА предварительно сокращенных фенилэфрином (1×10^{-5} М, в условиях блокады Ca^{2+}-активируемых K^+-каналов большой проводимости (ТЭА, 1×10^{-6} М) у крыс после нефрэктомии (НЭ) и контрольных крыс (ЛО). * – p<0,001.

Figure 4. Effect of acetylcholine (1×10^{-6} M) on the tone of aortic and BWA fragments previously reduced by phenylephrine (1×10^{-5} M, under conditions of blockade of Ca2 + -activated K + channels of high conductivity (TEA, 1×10^{-6} M) in rats after nephrectomy (NE) and control rats (LO). * – p <0,001.

такого влияния до настоящего времени изучены недостаточно. Исследование показало, что после НЭ повышается исходный тонус сосудов. Его рост сопровождается нарушением процессов регуляции функции ГМК сосудов, выражающемся в снижении величины реакции на действие биологических активных веществ, в частности АХ. Выявленное уменьшение амплитуды вазодилатации на добавление в раствор АХ указывает на снижение реактивности сосудов, что препятствует реализации полноценного ответа, характерного для сосудов контрольных животных. Однако механизмы такого влияния требуют уточнения.

Существует множество путей, посредством которых возможна тонкая настройка тонуса сосудов в ответ на изменение состояния организма. Известно, что тонус сосудов регулируется импульсами, приходящими по нервным волокнам, модулируется балансом гормонов в крови и чувствительностью рецепторов к ним. Этот органный уровень регуляции кровообращения, несомненно, значим, однако не менее важным является путь, позволяющий менять характеристики локального кровотока в сосудах различного калибра. Он связан с функционированием эндотелиальных клеток, выстилающих внутреннюю поверхность сосуда [19, 20].

В настоящее время эндотелиальная дисфункция рассматривается в качестве одного из основных патогенетических факторов, приводящих к развитию сердечно-сосудистых нарушений при прогрессировании патологии почек. Во многих клинических и экспериментальных исследованиях выявлено нарушение эндотелийзависимой регуляции тонуса сосудов как у больных ХБП [21–24], так и у экспериментальных животных [25–27]. Однако конкретные механизмы развития эндотелиальной дисфункции при почечной патологии требуют дальнейшего изучения.

Для оценки состояния эндотелиальной регуляции сосудов крыс мы использовали сравнение величины ответа сосудистого фрагмента на воздействие вазоактивных агентов. Основным тестирующим веществом был выбран АХ, являющийся мощным вазодилататором, стимулирующим выработку NO через активацию М-холинорецепторов [28–31]. Наши исследования на сосудах in vitro показали, что нефрэктомия приводит к значительному снижению реактивности фрагментов как аорты, так и ВБА в ответ на введение АХ, что указывает на снижение регуляторных возможностей сосудистой системы. Для уточнения механизмов, участвующих в данном процессе, мы провели эксперименты с блокированием отдельных звеньев регуляторной цепочки.

Важным звеном регуляции тонуса сосудов считают механизмы, связанные с синтезом NO [32–34]. Мы предположили, что нефрэктомия будет приводить к нарушению связанных с продукцией NO путей регуляции сосудистого тонуса. Предположение основывалось также на наших предыдущих экспериментах, показавших снижение уровня NO в сыворотке крови спонтанно-гипертензивных крыс, подвергнутых резекции части почечной ткани [35]. Для уточнения NO-зависимых механизмов влияния НЭ непосредственно на эндотелийзависимую регуляцию тонуса сосудов мы провели тестирование фрагментов сосудов с использованием предварительного ингибирования синтазы NO введением L-NAME. Выявленное в настоящем исследовании снижение вазодилататорного ответа сосудов на АХ в условиях ингибирования синтеза NO у крыс после нефрэктомии (по сравнению с контрольными животными) указывает на повреждение связанных с продукцией NO путей модуляции сосудистого тонуса. Механизм подобных изменений до сих пор не ясен [34]. Характер сосудодвигательного ответа может быть обусловлен множеством факторов и, в частности, снижением синтеза NO [36, 37] и уменьшением его биодоступности [25, 38, 39].

Один из путей регуляции тонуса сосудов связывают с развитием гиперполяризации мембраны эндотелия [40, 41]. В этой регуляторной цепочке основная роль отводится эндотелиальным Ca^{2+}-активируемым K^+-каналам с различной скоростью проводимости, посредством которых обеспечивается распределение ионов K^+ в клетках эндотелия [42–44]. Полагают, что гиперполяризация эндотелия может напрямую распространяться через щелевые соединения в ГМК [42, 45] или посредством оттока K^+ из эндотелия через эндотелиальные Ca^{2+}-активированные K^+-каналы приводить к гиперполяризации ГМК и, следовательно, к вазодилатации [45]. Блокада одного из этих механизмов модуляции величины вазодилатации позволяет оценить их вклад в общую картину вазомоторного ответа сосуда на внешнее воздействие. Наши исследования показали, что в условиях блокады Ca^{2+}-активируемых K^+-каналов большой проводимости (введением ТЭА) амплитуда ответа на АХ значимо снижалась как у НЭ, так и у контрольных животных, что подтверждает участие этого механизма в ответных реакциях сосудов на АХ. Однако НЭ сопровождалась уменьшением степени дилатации сосудистых сегментов на воздействие АХ при предварительной обработке их ТЭА. Следовательно, удаление 5/6 массы почек приводит к нарушению связанных с гиперполяризацией мембраны эндотелиальных клеток путей регуляции тонуса сосудов.

Результаты наших исследований согласуются с имеющимися в литературе данными о снижении вазодилатирующей способности сосудов животных, подвергнутых уменьшению количества функционирующих нефронов [27, 46]. Механизмы выявленных нарушений полностью не ясны, поскольку, с одной стороны, эндотелиальная регуляция тонуса сосудов является мультифакторным процессом, а с другой – развитие ХБП приводит к дисбалансу различных вазоактивных метаболитов, влияющих на функцию сосудов [21, 25, 46, 47].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведенные исследования показали, что резекция 5/6 массы ткани почек у крыс вызывает снижение реактивности сосудов, связанное как с нарушением NO-зависимых путей, так и понижением уровня гиперполяризации клеток эндотелия. Такое снижение реактивности может приводить к дизрегуляции сосудистого тонуса, повышению сосудистого сопротивления, росту артериального давления, неадекватному ответу сосудов на воздействия биологически активных агентов и, таким образом, запускать патогенетические механизмы развития осложнений сердечно-сосудистой системы при ХПБ. Важность решения проблемы предупреждения и коррекции нарушений сосудистой системы при развитии почечной патологии требует дальнейшего более детального изучения.

Работа поддержана Грантом РФФИ 19-015-0047 .

Работа выполнена с использованием животных из биоколлекции ИФ РАН.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК
REFERENCES

1.Смирнов АВ, Добронравов ВА, Каюков ИГ. Кардиоренальный континуум: патогенетические основы превентивной нефрологии. *Нефрология* 2005; 9(3): 7–15 [Smirnov AV, Dobronravov VA, Kayukov IG. Kardiorenalnyj continuum: patogeneticheskie osnovy preventivnoj nefrologii. *Nefrologiya* 2005; 9(3):7–15]

2. Di Lullo L, Bellasi A, Barbera V et al. Pathophysiology of the cardio-renal syndromes types 1-5: An uptodate. *Indian Heart J* 2017; 69(2): 255–265. Doi: 10.1016/j.ihj.2017.01.005

3. Foley RN, Parfrey PS. Cardiac disease in chronic uremia: clinical outcome and risk factors. *Adv Renal Replace Ther* 1997; 4: 234–248

4.Go AS, Chertow GM, Fan D et al. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med* 2004; 351: 1296–1305. Doi: 10.1056/NEJMoa041031

5. Ninomiya T, Kiyohara Y, Kubo M et al. Chronic kidney disease and cardiovascular disease in a general Japanese population: the Hisayama Study. *Kidney Int* 2005; 68 (1): 228–236

6. Afsar B, Turkmen K, Covic A, Kanbay M. An update on coronary artery disease and chronic kidney disease. *Int J Nephrol* 2014; 76(7): 424. Doi: 10.1155/2014/767424

7. Choi HY, Park HC, Ha SK. How do We manage coronary artery disease in patients with CKD and ESRD? *Electrolyte Blood Press* 2014; 12 (2): 41–54. Doi: 10.5049/EBP.2014.12.2.41

8. Padberg JS, Wiesinger A, di Marco GS. et al. Damage of the endothelial glycocalyx in chronic kidney disease. *Atherosclerosis* 2014; 234(2): 335–343. Doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2014.03.016

9. Foley RN, Wang C, Collins AJ. Cardiovascular risk factor profiles and kidney function stage in the US general population: the NHANES III study. *Mayo Clin Proc* 2005; 80(10): 1270–1277. Doi: 10.4065/80.10.1270

10. Baber U, Gutierrez OM, Levitan EB et al. Risk for recurrent coronary heart disease and all-cause mortality among individuals with chronic kidney disease compared with diabetes mellitus, metabolic syndrome, and cigarette smokers. *Am Heart J* 2013; 166(2): 373–380.e2. Doi: 10.1016/j.ahj

11. Jimbo R, Shimosawa T. Cardiovascular risk factors and chronic kidney disease-FGF23: a key molecule in the cardiovascular disease. *Int J Hypertens* 2014; 182: 82–98. Doi: 10.1155/2014/381082

12. Mancia G, Fagard R, Zanchetti A. Reply to blood pressure target in chronic kidney disease. *J Hypertens* 2013; 31(11): 2321–2322. Doi: 10. 1097/HJH. 0b013e328365a00a

13. Карабаева АЖ, Есаян АМ, Каюков ИГ и др. Влияние спиронолактона на гипертрофию миокарда левого желудочка у крыс Вистар с экспериментальной уремией. *Бюлл экспериментальной биологии и медицины* 2008; 145(6): 659–662 [Karabaeva AZH, Esayan AM, Kayukov IG i dr. Vliyanie spironolaktona na gipertrofiyu miokarda levogo zheludochka u krys vistar s ehksperimentalnoj uremiej. *Byull ehksperimentalnoj biologii I mediciny* 2008; 145(6): 659–662]

14. Каюков ИГ, Береснева ОН, Парастаева ММ и др. Влияние возраста и сокращения массы действующих нефронов на состояние миокарда и коронарного русла у молодых крыс. *Регионарное кровообращение и микроциркуляция* 2015; 14(4): 66–73 [Kayukov IG, Beresneva ON, Parastaeva MM i dr. Vliyanie vozrasta i sokrashcheniya massy dejstvuyushchih nefronov na sostoyanie miokarda i koronarnogo rusla u molodyh krys. *Regionarnoe krovoobrashchenie i mikrocirkulyaciya* 2015; 14(4): 66–73]

15. Maquigussa E, Paterno JC, de Oliveira Pokorny GH et al. Klotho and PPAR gamma activation mediate the renoprotective effect of losartan in the 5/6 nephrectomy model. *Front Physiol* 2018; 9: 1033. Doi: 10.3389/fphys.2018.01033

16. Shobeiri N, Adams MA, Holden RM. Vascular calcification in animal models of CKD: A review. *Am J Nephrol* 2010; 31(6): 471–481. Doi: 10.1159/000299794

17. Claramunt D, Gil-Peña H, Fuente R et al. Animal models of pediatric chronic kidney disease. Is adenine intake an appropriate model? *Nefrologia* 2015; 35(6): 517–522. Doi: 10.1016/j.nefro.2015.08.004

18. Лобов ГИ, Васина ЕЮ, Малахова ЗЛ, Власов ТД. Роль различных эндотелиальных вазодилататоров в регуляции тонуса артерий у крыс. *Росс физиол журн им ИМ Сеченова* 2018; 104 (3): 327–337 [Lobov GI, Vasina EYU, Malahova ZL, Vlasov TD. Rol razlichnyh ehndotelialnyh vazodilatatorov v regulyacii tonusa arterij u krys. *Ross fiziol zhurn im IM Sechenova* 2018; 104 (3): 327–337]

19. Kang KT. Endothelium-derived relaxing factors of small resistance arteries in hypertension. *Toxicol Res* 2014; 30(3): 141–148. Doi: 10.5487/TR.2014.30.3.141

20. Scotland RS, Madhani M, Chauhan S, Moncada S et al. Investigation of vascular responses in endothelial nitric oxide synthase/cyclooxygenase-1 double-knockout mice: key role for endothelium-derived hyperpolarizing factor in the regulation of blood pressure in vivo. *Circulation* 2005; 111(6): 796–803. Doi: 10.1161/01.CIR.0000155238.70797.4E

21. Huang MJ, Wei RB, Zhao J et al. Albuminuria and endothelial dysfunction in patients with non-diabetic chronic kidney disease. *Med Sci Monit* 2017; 23: 4447–4453. Doi: 10.12659/MSM.903660

22. Fujii H, Kono K, Nishi S. Characteristics of coronary artery disease in chronic kidney disease. *Clin Exp Nephrol* 2019; Doi: 10.1007/s10157-019-01718-5

23.Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF, Vita JA. The clinical implications of endothelial dysfunction. *Journal of the American College of Cardiology* 2003; 42(7): 1149–1160 Doi:10.1016/S0735-1097(03)00994-X

24. Smiljić S. The clinical significance of endocardial endothelial dysfunction. *Medicina* 2017; 53(5): 295–302. Doi: 10.1016/j.medici.2017.08.003

25. Martens CR, Kuczmarski JM, Lennon-Edwards S, Edwards DG. Impaired L-arginine uptake but not arginase contributes to endothelial dysfunction in rats with chronic kidney disease. *J Cardiovasc Pharmacol* 2014; 63(1): 40–48. Doi: 10.1097/FJC.0000000000000022

26. Li T, Gua C, Wu B, Chen Y. Increased circulating trimethylamine N-oxide contributes to endothelial dysfunction in a rat model of chronic kidney disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2018; 495(2): 2071–2077. Doi: 10.1016/j.bbrc.2017.12.069

27. Zanetti M, Gortan Cappellari G, Barbetta D et al. Omega 3 polyunsaturated fatty acids improve endothelial dysfunction in chronic renal failure: role of eNOS activation and of oxidative stress. *Nutrients* 2017; 9(8): E895. Doi: 10.3390/nu9080895

28. Панина И Ю, Румянцев АШ, Меншутина МА и др. Особенности функций эндотелия при хронической болезни почек. Обзор литературы и собственные данные. *Нефрология* 2007; 11(4): 28–46 [Panina IY, Rumyantsev ASH, Menshutina MA, Achkasova VV, i dr. Osobennosti funktsij ehndoteliya pri khronicheskoj bolezni pochek. Obzor literatury i sobstvennye dannye. *Nefrologiya* 2007; 11(4): 28–46]

29. Zoccali C, Mallamaci F, Tripepi G. Traditional and emerging cardiovascular risk factors in end-stage renal disease. *Kidney Int* 2003; 85: S105–S110. Doi: 10.1046/j.1523-1755.63.s85.25.x

30. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373–376

31. Boulanger CM, Morrison KJ, Vanhoutte PM . Mediation by M3-muscarinic receptors of both endothelium-dependent contraction and relaxation to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Br J Pharmacol* 1994; 112: 519–524

32. Toda N, Ayajiki K, Okamura T. Neurogenic and endothelial nitric oxide regulates blood circulation in lingual and other oral tissues. *J Cardiovasc Pharmacol* 2012; 60: 100–108. Doi: 10.1097/FJC.0b013e318252452a

33. Michel T, Vanhoutte PM. Cellular signalling and NO production. *Pflugers Arch* 2010; 459: 807–816

34. Vanhoutte PM , Shimokawa H, Feletou M, Tang EHC. Endothelial dysfunction and vascular disease – a 30th anniversary update. *Acta Physiol* 2017; 219: 22–96. https://Doi.org/10.1111/apha.12646

35. Береснева ОН, Парастаева ММ, Иванова ГТ и др. Оценка кардиопротективного действия малобелковой соевой диеты и уровень неорганических анионов сыворотки крови у спонтанно-гипертензивных крыс с нефрэктомией *Нефрология* 2007; 11(3): 70–76 [Beresneva ON, Parastayeva MM, Ivanova GT i dr. Otsenka kardioprotektivnogo deystviya malobelkovoy soyevoy diyety i urovnya neorganicheskikh anionov v syvorotke krovi u spontanno-gipertenzivnykh krys s nefrektomiyey. *Nefrologiya* 2007; 11 (3): 70–76]

36. Puzserova A, Bernatova I. Blood pressure regulation in stress: focus on nitric oxide-dependent mechanisms. *Physiol Res* 2016; 65 (Suppl. 3): S309–S342

37. Yamamizu K, Shinozaki K, Ayajiki K, et al. Oral administration of both tetrahydrobiopterin and L-arginine prevents endothelial dysfunctionin rats with chronic renal failure. *J Cardiovasc Pharmacol* 2007; 49(3): 131–139. Doi: 10.1097/FJC.0b013e31802f9923

38. Xu YC, Leung SW, Leung GP, Man RY. Kaempferol enhances endothelium-dependent relaxation in the porcine coronary artery through activation of large-conductance Ca(2+) activated K(+) channels. *Br J Pharmacol* 2015; 172: 3003–3014. Doi: 10.1111/bph.13108

39. Jang HJ, Ridgeway SD, Kim JA. Effects of the green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate on high-fat diet-induced insulin resistance and endothelial dysfunction. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2013; 305: E1444–E1451

40. Félétou M, Vanhoutt PM. . Endothelium-dependent hyperpolarization: no longer an f-word! *J Cardiovasc Pharmacol* 2013; 61: 91–92. Doi: 10.1097/FJC.0b013e31828197bc

41. Shimokawa H. Williams Harvey Lecture: importance of coronary vasomotion abnormalities-from bench to bedside. *Eur Heart* 2014; J 35: 3180–3193. Doi: 10.1093/eurheartj/ehu427

42. Busse R, Edwards M, Feletou M et al. EDHF: Bringing the concepts together. *Trends Pharmacol Sci* 2002; 23: 374–380

43. Eichler I, Wibawa J, Grgic I et al. Selective blockade of endothelial Ca^{2+}-activated small- and intermediate-conductance K^+-channels suppresses EDHF-mediated vasodilation. *Br J Pharmacol* 2003; 138: 594–601 https://Doi.org/10.1038/sj.bjp.0705075

44. Edwards G, Dora KA, Gardener MJ, et al. K^+ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature* 1998; 396: 269–272 https://Doi.org/10.1038/24388

45. Griffith TM, Chaytor AT, Taylo HJ, et al. cAMP facilitates EDHF-type relaxations in conduit arteries by enhancing electronic conduction via gap junctions. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 6392–6397 https://Doi.org/10.1073/pnas.092089799

46. Köhler R, Eichler I, Schönfelder H et al. Impaired EDHF-mediated vasodilation and function of endothelial Ca-activated K channels in uremic rats. *Kidney Int* 2005; 67(6): 2280–2287. Doi: 10.1111/j.1523-1755.2005.00331.x

47. Li T, Gua C, Wu B, Chen Y. Increased circulating trimethylamine N-oxide contributes to endothelial dysfunction in a rat model of chronic kidney disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2018; 495(2): 2071–2077. Doi: 10.1016/j.bbrc.2017.12.069

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
The authors declare no conflict of interest.

Сведения об авторах:
Author information:

Иванова Галина Тажимовна, канд. биол. наук
199034, Россия, Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 6. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, лаборатория физиологии сердечно-сосудистой и лимфатической систем, старший научный сотрудник. Тел.: 8 (812) 328-07-01, E-mail: tazhim@list.ru
Ivanova Galina Tazhimovna, PhD
Affiliation: 199034, Russia. Saint-Petersburg, Makarova Emb., 6, I. P. Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences. senior researcher Phone: 8 (812) 328-07-01, E-mail: tazhim@list.ru.

Проф. Лобов Геннадий Иванович, д-р мед. наук
199034, Россия, Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 6. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, лаборатория физиологии сердечно-сосудистой и лимфатической систем, заведующий лабораторией. Тел.: +7 921 743-06-08, E-mail: LobovGI@infran.ru
Lobov Gennadii Ivanovich, PhD, DMedSci
Affiliation: 199934, Russia, Saint-Petersburg, Makarova Emb., 6., Pavlov Institute of Physiology RAS, head of laboratory. Ph. +7 921 7430608, E-mail: LobovGI@infran.ru

Парастаева Марина Магрезовна, канд. биол. наук
197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого, д. 17, корп. 54. Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Научно-исследовательский институт нефрологии, лаборатория клинической физиологии почек, ст. научн. сотр. Тел.: (812) 346-39-26, E-mail marina_parastaeva@list.ru
Marina M. Parastaeva – PhD,
Affiliation: 197022, Russia, St-Petersburg, L.Tolstoy st., 17, build. 54 First Pavlov St.-Petersburg State Medical University Institute of Nephrology Laboratory of Clinical Physiology of the Kidney senior researcher. Phone (812)346-39-26; E-mail marina_parastaeva@list.ru

Береснева Ольга Николаевна, канд. биол. наук
197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого, д. 17, корп. 54. Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Научно-исследовательский институт нефрологии, лаборатория клинической физиологии почек, ст. научн. сотр. Тел.: (812) 346-39-26, E-mail beresnevaolga@list.ru
Olga N. Beresneva, PhD,
Affiliation: 197022, Russia, St-Petersburg , L.Tolstoy st., 17, build. 54 First Pavlov St.-Petersburg State Medical University Institute of Nephrology Laboratory of Clinical Physiology of the Kidney, senior researcher. Phone (812)346-39-26; E-mail beresnevaolga@list.ru. ORCID: 0000-0002-7532-2405

Поступила в редакцию: 01.03.2019
Принята в печать: 21.05.2019
Article received: 01.03.2019
Accepted for publication: 21.05.2019