

© Т.А.Барабанова, 2005
УДК 611.127+611.018.74]:615.849.19.001.5

Т.А. Барабанова

ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ И L-АРГИНИНА НА МЕХАНИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ МИОКАРДА КРЫС ВИСТАР С ПРИОБРЕТЕННОЙ ДИСФУНКЦИЕЙ ЭНДОТЕЛИЯ

T.A. Barabanova

SPECIFIC EFFECTS OF LOW INTENSITY LASER RADIATION AND L-ARGININE ON MYOCARDIUM ACTIVITY OF WISTAR RATS WITH THE ACQUIRED DYSFUNCTION OF ENDOTHELIUM

Лаборатория клинической и экспериментальной кардиологии Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

РЕФЕРАТ

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ. Сравнительное исследование действия низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ) с длиной волны 632,8 нм и субстрата для синтеза NO L-аргинина на механическую активность кардиомиоцитов контрольных крыс Вистар и крыс Вистар с экспериментальной хронической почечной недостаточностью (ХПН – хирургическая модель). **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** В условиях изометрического режима проведен анализ влияния НИЛИ и L-аргинина на сократимость миокарда крыс с ХПН. Хирургическая модель ХПН одновременно является и моделью дефицита синтеза NO. Развитие уремии отслеживали по биохимическим показателям крови. Для определения степени повреждения эндотелия был использован метод определения количества циркулирующих эндотелиоцитов. **РЕЗУЛЬТАТЫ.** При добавлении L-аргинина в перфузионный раствор сила изометрических сокращений кардиомиоцитов контрольных крыс Вистар к 10-й минуте инкубации увеличивалась в среднем на $38,0 \pm 5,2\%$. Лазерное облучение приводило к дополнительному увеличению силы сокращений. Добавление L-аргинина на фоне выраженного эффекта лазерного облучения также сопровождалось ростом силы сокращений. Суммарный эффект действия He-Ne лазера и L-аргинина не зависел от последовательности их влияния. У крыс Вистар с экспериментальной ХПН при уровне мочевины $13,8 \pm 3,1$ ммоль/л действие L-аргинина на силу изометрических сокращений крыс с ХПН было также однонаправленным. Суммарный эффект L-аргинина и НИЛИ на миокард крыс с ХПН превышал эффект действия на миокард контрольных крыс в 2-2,5 раза. **ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Результаты исследования показали практически полное восстановление функции миокарда крыс с ХПН до уровня интактных животных под влиянием НИЛИ и L-аргинина, что свидетельствует о возможности дополнительного синтеза NO в миокарде при увеличении содержания субстрата в инкубационной среде при данном уровне мочевины. Мы полагаем, что в этот период развития ХПН активно функционируют эндокардиальные клетки, обеспечивающие необходимое количество NO в миокарде.

Ключевые слова: миокард, сократимость, L-аргинин, НИЛИ, хроническая почечная недостаточность.

ABSTRACT

THE AIM of the investigation was a comparative study of effects of the low intensity laser radiation (LILR) with the wave length 632.8 nm and a substrate for synthesis of nitric oxide (NO) L-arginine on mechanical activity of cardiomyocytes of control Wistar rats and Wistar rats with experimental chronic renal failure (CRF - a surgical model). **MATERIAL AND METHODS.** Effects of LILR and L-arginine on contractility of the myocardium of rats with CRF were analyzed under conditions of the isometric regimen. The surgical model of CRF is simultaneously the model of NO synthesis deficiency. The development of uremia was followed according to the biochemical indices of blood. The method of determination of the number of circulating endotheliocytes was used to determine the degree of the endothelium lesion. **RESULTS.** An addition of L-arginine to the perfusion solution resulted in the approximately $38.0 \pm 5.2\%$ greater force of isometric contractions of cardiomyocytes of control Wistar rats by the 10th minute of incubation. Laser irradiation resulted in an additionally increased force of contractions. An addition of L-arginine against the background of effects of laser irradiation was also followed by growth of the contraction force. The total effect of He-Ne laser and L-arginine did not depend on the succession of their effect. In Wistar rats with experimental CRF with the urea level 13.8 ± 3.1 mmol/l the action of L-arginine on the force of isometric contractions of rats with CRF was also of the same direction. The total effect of L-arginine and LILR on the myocardium of rats with CRF was 2-2.5 times greater than that of action on the myocardium of control rats. **CONCLUSION.** The investigation results have shown practically complete reestablishment of the myocardium function in rats with CRF up to the level of control rats under the influence of LILR and L-arginine that speaks of the possible additional synthesis of NO in the myocardium with a greater content of the substrate in the incubation medium and the given urea level. The endocardial cells responsible for the necessary amount of NO in the myocardium are thought to be actively functioning at this period of the development of CRF.

Key words: myocardium, contractivity, L-arginine, low intensity laser radiation, chronic renal failure.

ВВЕДЕНИЕ

С аминокислотой L-аргинином связаны большие надежды в терапии сердечно-сосудистых за-

болеваний [1,2]. Поэтому понятен интерес к исследованию роли дополнительного количества L-аргинина (субстрата для синтеза NO) в эффектах

лазерного облучения миокарда у крыс с приобретенной дисфункцией эндотелия. Интерес этот обусловлен также фактом повышения концентрации L-аргинина в крови животных на раннем этапе развития уремии [3], когда уже отмечается дефицит NO и увеличение количества циркулирующих десквамированных эндотелиоцитов, свидетельствующее о повреждении эндотелия

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе использовались самцы крыс линии Вистар массой 220-240 г следующих групп: ложнооперированные крысы (ЛО) и крысы с двухэтапной резекцией 5/6 почечной ткани (нефрэктомия) [3,4].

Метод нефрэктомии (НЭ) традиционно используется при изучении патогенеза уремии и является моделью ХПН, при которой значительная редукция функциональной массы сочетается с прогрессирующим гломерулосклерозом и протеинурией [5,6]. Хирургическая модель ХПН одновременно является и моделью дефицита синтеза NO, уменьшение синтеза которого отрицательно коррелирует с уровнем эндотелина, способствующего развитию ХПН [7].

В ходе эксперимента животные содержались на стандартном лабораторном пищевом рационе и свободном потреблении воды.

Развитие уремии отслеживали по биохимическим показателям крови и мочи с использованием унифицированных методик (анализы выполнены на биохимическом анализаторе COBAS MIRA). Через 1 месяц после второго этапа операции (табл. 1) животные были использованы для проведения экспериментов *in vitro*.

Для определения степени повреждения эндотелия был использован метод определения количества циркулирующих эндотелиоцитов, предложенный J. Nladovec [8]. Опыты проводились на кафедре патофизиологии СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова совместно с Чефу С.Г.

Механическую активность папиллярной мышцы исследовали в изометрическом режиме. При регистрации сокращений в изометрическом режиме в качестве измеряемых параметров служили: максимум силы изометрического сокращения (P_0) и характерное время расслабления до 30 % от его максимальной амплитуды (t_{30}), характеризующее скорость изометрического расслабления. Описание сервосистемы и деталей эксперимента дано ранее [9,10].

Концентрация L-аргинина в инкубационном растворе – 0,2 мг/мл.

Источник лазерного излучения Шатл-1 (He-Ne,

длина волны 632,8 нм, плотность мощности 15 мВт/см², экспозиция 5 минут). Луч направлялся на папиллярную мышцу с расстояния 10 мм (диаметр пятна 1 см²).

После 40 минут перфузии в физиологическом растворе папиллярную мышцу подвергали 5-минутному лазерному облучению, затем на 11-й минуте в перфузионный раствор вводили L-аргинин в указанной концентрации. В следующей серии опытов после 40 минут перфузии в контрольном растворе добавляли L-аргинин и спустя 10 минут проводили облучение папиллярной мышцы и регистрацию изометрических сокращений до прекращения изменения амплитуды.

Результаты исследований обрабатывались статистически с применением критериев Стьюдента и Уилкоксона. Все величины, указанные в работе, представлены как средние значения + среднее квадратичное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Через 1 месяц после второго этапа операции у крыс с нефрэктомией констатирована уремия I степени ($13,8 \pm 3,1$ ммоль/л, $p < 0,01$ по сравнению с контролем) (ХПН-1). Артериальное давление (АД) у intactных крыс Вистар составляло $108,5 \pm 9,4$ мм рт. ст. У крыс с ХПН АД ($135,0 \pm 11,3$ мм рт. ст.) было достоверно ($p < 0,01$) выше, чем у контрольных. В контроле количество циркулирующих эндотелиоцитов составляло $3,0 \pm 0,9 \times 10^4$ /л. У всех животных с ХПН десквамация эндотелия резко повышалась ($7,1 \pm 1,9 \times 10^4$ /л, $p < 0,01$).

Содержание в плазме крови субстрата для биосинтеза NO L-аргинина у животных контрольной группы составляло $94,3 \pm 2,5$ мМ, а у крыс с ХПН – на 40% выше ($132,5 \pm 8,2$ мМ, $p < 0,01$).

Влияние L-аргинина и НИЛИ на механическую активность миокарда контрольных крыс и крыс с ХПН. При добавлении L-аргинина в перфузионный раствор сила изометрических сокращений и скорость расслабления кардиомиоцитов контрольных крыс Вистар к 10-й минуте инкубации увеличивалась в среднем на $38,0 \pm 5,2\%$ и $10,0 \pm 2,9\%$ соответственно. После 10-минутной инкубации папиллярной мышцы в растворе с L-аргином проводили лазерное облучение. Во всех опытах в период 5-минутного облучения He-Ne лазером не наблюдалось дополнительных сдвигов регистрируемых параметров ($n = 11$). В пострadiационный период отмечалось постепенное увеличение силы изометрического сокращения и скорости расслабления, которое достигало максимума на 10-й минуте и составляло $55,6 \pm 4,9\%$ и $15,0 \pm 2,6\%$ соответственно (рис. 1). Таким образом,

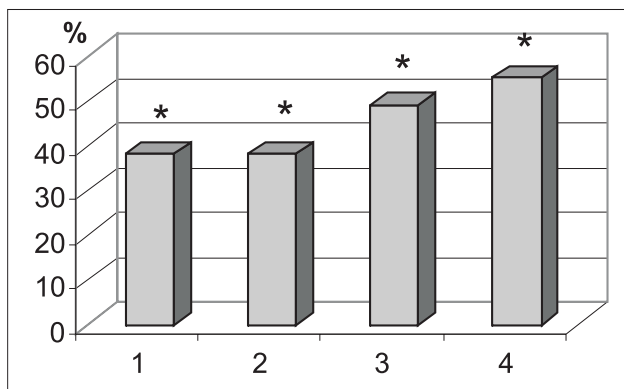


Рис. 1. Влияние 5-минутного лазерного облучения (632,8 нм, 15 мВт/см²) на силу изометрических сокращений папиллярной мышцы миокарда крыс Вистар на фоне действия L-аргинина (0,2 мг/мл) в % к исходному уровню. 1 – 10 мин действия L-аргинина; 2 – 5 мин действия лазерного облучения; 3 – 10 мин пострadiaционного периода; 4 – 15 мин пострadiaционного периода.

эффекты действия L-аргинина и НИЛИ суммировались, дополняя один другого.

В следующей серии опытов L-аргинин добавляли в перфузионный раствор на 11-16-й минутах пострadiaционного периода после 5-минутного облучения. К этому времени проявлялся эффект действия НИЛИ. На фоне устойчивого увеличения силы изометрического сокращения и скорости расслабления L-аргинин в первые 5 минут перфузии не оказывал видимого действия на регистрируемые параметры, но к 10-й минуте перфузии отмечалось дополнительное увеличение амплитуды в среднем на $24,7 \pm 3,2\%$. Скорость расслабления при этом не изменялась. Общий прирост амплитуды составлял $60,3 \pm 4,2\%$ ($n = 9$) (рис. 2).

Таким образом: а) действие НИЛИ и L-аргинина было однонаправленным и б) суммарный эффект действия He-Ne лазера и L-аргинина не зависел от последовательности их влияния и составляет в среднем $57,8 \pm 5,1\%$. Дополнительное ведение субстрата для синтеза EDRF – NO L-аргинина в перфузионный раствор усиливало эффект действия НИЛИ на механическую активность миокарда контрольных крыс Вистар.

У крыс Вистар с экспериментальной ХПН при уровне мочевины $13,8 \pm 3,1$ ммоль/л ($n=12$) регистрировалось снижение силы изометрических сокращений до патологически низких величин ($151,0 \pm 6,7$ мг) по сравнению с контрольными животными ($320,0 \pm 8,9$ мг). Действие L-аргинина на силу изометрических сокращений крыс с ХПН было однонаправленным с его влиянием на P_0 контрольных животных. Однако количественная выраженность эффекта значительно превышала его действие на миокард контрольных крыс. Сила патологически низких сокращений миокарда крыс с ХПН под влиянием L-аргинина значительно увеличивалась, до-

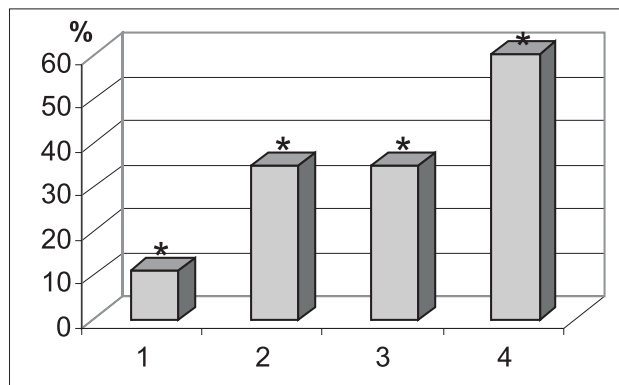


Рис. 2. Влияние L-аргинина на фоне выраженного действия НИЛИ на силу изометрических сокращений папиллярной мышцы миокарда крыс Вистар в % к исходному уровню. 1 – 5 мин действия лазерного облучения. 2 – 10 мин пострadiaционного периода; 3 – 5 мин действия L-аргинина; 4 – 10 мин действия L-аргинина.

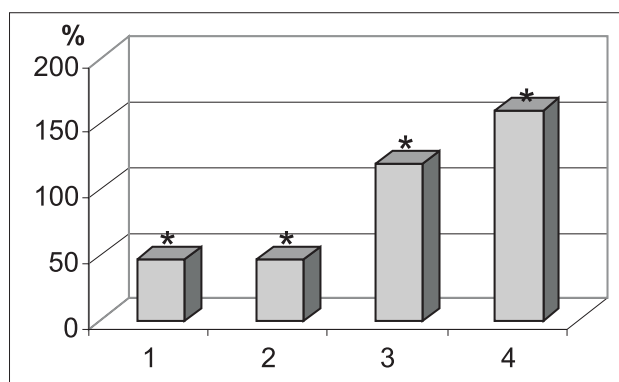


Рис. 3. Влияние 5 минутного лазерного облучения (632,8 нм, 15 мВт/см²) на силу изометрических сокращений папиллярной мышцы миокарда крыс с ХПН на фоне действия L-аргинина (0,2 мг/мл) в % к исходному уровню. 1 – 10 мин действия L-аргинина; 2 – 5 мин действия лазерного облучения; 3 – 10 мин пострadiaционного периода; 4 – 15 мин пострadiaционного периода.

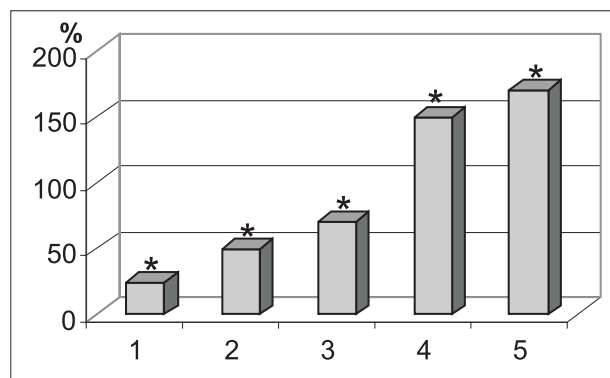


Рис. 4. Влияние L-аргинина на фоне выраженного действия НИЛИ на силу изометрических сокращений папиллярной мышцы миокарда крыс с ХПН в % к исходному уровню. 1 – 5 мин действия лазерного облучения; 2 – 5 мин пострadiaционного периода; 3 – 10 мин пострadiaционного периода; 4 – 10 мин действия L-аргинина; 5 – 15 мин действия L-аргинина.

стигая в ряде опытов значений контрольных животных (рис. 3). Скорость изометрических сокращений увеличивалась незначительно: t_{30} уменьшалась на 8-12%.

Действие НИЛИ на миокард крыс с ХПН на фоне выраженного эффекта L-аргинина было односторонним и усиливало эффект последнего. Однако в 5-минутный период непосредственного облучения дополнительного роста силы изометрических сокращений не наблюдалось, а в пострadiационный период отмечалось резкое повышение сократимости, когда сила сокращений увеличивалась в 2,5 – 3 раза. Скорость расслабления при максимальном увеличении силы сокращения изменялась незначительно, t_{30} снижалась лишь на $15,2 \pm 3,2\%$.

Суммарный эффект L-аргинина и НИЛИ на миокард крыс с ХПН превышал эффект действия на миокард контрольных крыс в 2 – 2,5 раза. Таким образом, добавление субстрата для синтеза NO в перфузионный раствор усиливало действие НИЛИ на миокард животных с приобретенной дисфункцией синтеза NO и приводило к полному восстановлению патологически низкой механической активности миокарда крыс с ХПН до уровня контрольных животных через 10 минут после прекращения облучения. Дальнейшее наблюдение показало, что через 15–20 минут после прекращения облучения P_0 достигало еще больших величин, свидетельствующих о гиперактивности миокарда (рис. 3).

У контрольных крыс Вистар и крыс с ХПН при действии НИЛИ без добавления L-аргинина к 10-й минуте пострadiационного периода прекращался рост силы изометрического сокращения и P_0 не изменялось в течение последующих 10–20 минут наблюдения. На фоне L-аргинина пострadiационный период изменений механической активности миокарда крыс с ХПН удлинялся до 25–30 минут.

В следующей серии опытов последовательность действия L-аргинина и НИЛИ была изменена. L-аргинин вводился в перфузионный раствор после 10 – 15-минутного пострadiационного периода, то есть когда прекращались изменения силы и скорости расслабления миокарда крыс с ХПН. НИЛИ оказывало обычное действие: увеличение силы сокращения и незначительное повышение скорости расслабления. Максимальный эффект действия НИЛИ на силу изометрических сокращений регистрировался только к 10-й минуте пострadiационного периода и увеличение P_0 составляло в среднем $70,7 \pm 9,6\%$ по сравнению с исходным уровнем (рис. 4). Следующие 15 – 20 минут амплитуда изометрических сокращений не изменялась. Скорость расслабления увеличивалась за весь период наблюдения на $15,4 \pm 2,9\%$. На фоне устойчивого увеличения силы изометрического сокращения L-аргинин вызывал резкий рост силы

сокращений, амплитуда увеличивалась в 2 и более раза. Таким образом, как и в предыдущей серии исследований, L-аргинин и НИЛИ дополняли эффект один другого. Суммарный эффект их действия не зависел от последовательности влияния на миокард. НИЛИ приводило к практически полному восстановлению механической активности миокарда крыс с ХПН при мочеvine крови $13,8 \pm 3,1$ моль/л. Добавление L-аргинина усиливало механическую активность миокарда и формировало адаптивную гиперактивность. Скорость расслабления при гиперактивности не изменялась. Подводя итог исследованию роли субстрата для синтеза NO в действии НИЛИ на миокард крыс с ХПН следует отметить, что L-аргинин вызывал рост продолжительности действия НИЛИ и увеличение количественной выраженности эффекта.

ОБСУЖДЕНИЕ

Хирургическая модель ХПН одновременно является и моделью дисфункции эндотелия. Показанная нами повышенная десквамация эндотелия при экспериментальной уремии-I свидетельствует о том, что у крыс после НЭ уже на I стадии уремии происходят не только регенерационные процессы, но и повреждение сосудистой стенки.

В последние годы появились данные о доминирующей роли монооксида азота (NO) в механизме гемодинамических нарушений, связанных с почечной патологией [11,12].

Снижение почечного биосинтеза аргинина при прогрессивном снижении почечной функции может быть компенсировано снижением превращения аргинина в орнитин аргиназой, которая в избытке присутствует в почках. Гипертрофия проксимальных канальцев оставшихся нефронов увеличивает их аргинин-синтазную емкость, гиперфилтрация увеличивает порцию проходящего через них цитрулина и повышенная концентрация цитрулина в плазме способствует сохранению почечного синтеза аргинина [3]. Кроме того, повышение концентрации мочевины в крови у крыс с нефрэктомией и по принципу обратной связи может подавлять превращение L-аргинина в печени в цикле аргинина.

Все вышесказанное позволяет объяснить повышенную концентрацию L-аргинина в плазме крови у крыс с нефрэктомией в наших опытах. Таким образом, дефицита субстрата для eNOS у этих крыс не было. Однако добавление L-аргинина приводило к значительному увеличению силы изометрических сокращений и незначительному росту скорости расслабления, что свидетельствует о восстановлении механической активности патологически измененного миокарда крыс с ХПН,

характеризующихся нарушением функции эндотелия сосудов, а следовательно, синтеза NO. Создается впечатление, что повреждение эндотелия, как и патологическое снижение механической активности миокарда у крыс с ХПН не влияет на характер его ответа на L-аргинин и НИЛИ. Более того, действие НИЛИ на миокард этих животных превышает его эффект, зарегистрированный на миокард контрольных крыс Вистар. Мы полагаем, что восстановление патологически измененной механической активности миокарда крыс с ХПН под влиянием L-аргинина и НИЛИ обусловлено наличием эндокардиальных клеток и ростом уровня L-аргинина в крови животных на ранних стадиях развития ХПН. В миокарде, видимо, L-аргинин используется для синтеза NO эндокардиальными клетками [13]. В ряде работ отмечено положительное инотропное действие NO и влияние на процессы расслабления. Эндогенный NO повышает сократимость миокарда только в низких концентрациях, что, видимо, имеет место при действии НИЛИ и L-аргинина в исследуемых концентрациях [14,15].

Снижение сократимости кардиомиоцитов у экспериментальных животных естественно рассматривается как переход во вторую фазу функциональных изменений, характерных для развития ХПН-II. Однако факт практически полного восстановления функции миокарда до уровня интактных животных под влиянием НИЛИ и L-аргинина свидетельствует о возможности дополнительного синтеза NO в миокарде при увеличении содержания субстрата в инкубационной среде при данном уровне мочевины у крыс с экспериментальной ХПН. Очевидно, что в этот период развития ХПН активно функционируют эндокардиальные клетки, обеспечивающие необходимое количество NO в миокарде, и вся система кардиопептидов [13,16]. Активация последней осуществляется высоким венозным возвратом [17].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследования показали практически полное восстановление функции миокарда крыс с ХПН до уровня интактных животных под влиянием НИЛИ и L-аргинина, что свидетельствует о возможности дополнительного синтеза NO в миокарде при увеличении содержания субстрата в инкубационной среде при данном уровне мочевины.

Мы полагаем, что в этот период развития ХПН активно функционируют эндокардиальные клетки, обеспечивающие необходимое количество NO в миокарде.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Efron DT, Barbul A. Arginine and nutrition in renal disease. *J Ren Nutr* 1999; 9(3):142-144
2. Goumas G, Tentolouris C, Tousoulis D et al. Therapeutic modification of the L-arginine-eNOS pathway in cardiovascular diseases. *Atherosclerosis* 2001; 154 (2): 255-267
3. Bouby N, Hassler C, Parvy P, Bankir L. Renal synthesis of arginine in chronic renal failure: in vivo and in vitro studies in rats with 5/6 nephrectomy. *Kidney Int* 1993; 44 (4):676-683
4. Ormrod D, Miller T. Experimental uremia. *Nephron* 1980; 26 (5): 249-254
5. Anderson S, Rennke HG, Brenner BM. Therapeutic advantage of converting enzyme inhibitors in arresting progressive renal disease associated with hypertension in the rat. *J Clin Invest* 1986; 77:19-93
6. Olson JL, Hostetter TH, Rennke HG et al. Altered glomerular permselectivity and progressive sclerosis following extreme ablation of renal mass. *Kidney Int* 1982; 22 (2) 112-126
7. Potter GS, Johnson RJ, Fink GD. Role of endothelin in hypertension of experimental chronic renal failure. *Hypertension* 1997; 30 (6):1578-1584
8. Hladovec J, Prerovsky I, Stanec V, Fabian J. Circulating endothelial cells in acute myocardial infarction and angina pectoris. *Klin Wochenshr* 1978; 56:1033-1036
9. Барабанова ТА, Мархасин ВС, Никитина ЛВ, Чурина СК. Особенности влияния паратиреоидного гормона на механическую активность миокарда крыс при дефиците кальция и магния в питьевой воде. *Физиол Журн СССР им. И.М. Сеченова* 1992; 78 (7):71-77
10. Петрищев НН, Барабанова ВВ, Михайлова ИА, Чефу СГ. Влияние излучения He-Ne лазера на функциональную активность гладкомышечных клеток воротной вены. *Рос Физиол Журн им. И.М. Сеченова* 2001; 87 (5):659-664
11. Aiello S, Noris M, Remuzzi G, Mario Negri. Nitric oxide/L-arginine in uremia. *Miner Electrolyte Metab* 1999; 25 (4-6): 384-90
12. Шестакова МВ, Кутырина ИМ, Рагозин АК. Роль сосудистого эндотелия в регуляции почечной гемодинамики. *Тер Арх* 1994; (2): 83-86
13. Leskinen H, Vuolteenaho O, Leppaluoto J, Ruskoaho H. Role of nitric oxide on cardiac hormone secretion: effect of NG-nitro-L-arginine methyl ester on atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide release. *Endocrinology* 1995; 36 (3): 1241-1249
14. Weiss HR, Sadoff JD, Scholz PM, Klabunde RE. Nitric oxide reduces myocardial contractility in isoproterenol-stimulated rat hearts by a mechanism independent of cyclic GMP or cyclic AMP. *Pharmacology* 1997; 55 (4): 202-210
15. Cotton JM, Kearney MT, MacCarthy PA et al. Effects of nitric oxide synthase inhibition on basal function and the force-frequency relationship in the normal and failing human heart in vivo. *Circulation* 2001; 104 (19): 2318-2323
16. Lang RE, Thocken H, Gauten D. Atrial natriuretic factor — circulating hormone stimulated by volume loading. *Nature* 1985; 314: 264-266
17. Штенгольд ЕШ, Годин ЕА, Колмановский ВБ. *Регулирование напряженно-деформированного состояния сосудов и гипертоническая болезнь*. Наука, М., 1990

Поступила в редакцию 16.01.2005 г.