

© Н.Н.Петрищев, А.В.Смирнов, Т.А.Барабанова, А.А.Жлоба, С.Г.Чефу, 2007
УДК 616.61-008.64-036.92:616.149]:615.849.19+577.17-092.4

Н.Н. Петрищев, А.В. Смирнов, Т.А. Барабанова, А.А. Жлоба, С.Г. Чефу

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕЙСТВИЯ He-Ne ЛАЗЕРА И L-АРГИНИНА НА ГЛАДКОМЫШЕЧНЫЕ КЛЕТКИ ВОРОТНОЙ ВЕНЫ И МИОКАРД КРЫС С ХПН

N.N. Petrishchev, A.V. Smirnov, T.A. Barabanova, A.A. Zhloba, S.G. Chifu

COMPARATIVE INVESTIGATION OF THE INFLUENCE OF HE-NE LASER AND L-ARGININE ON THE SMOOTH MUSCLE CELLS OF THE PORTAL VEIN AND MYOCARDIUM OF RATS WITH CRF

Центр лазерной медицины, кафедра патофизиологии, научно-исследовательский институт нефрологии и сектор биохимии научно-исследовательского центра Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П.Павлова, лаборатория клинической и экспериментальной кардиологии Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

РЕФЕРАТ

ЦЕЛЬ РАБОТЫ – сравнительное исследование влияния низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ) с длиной волны 632,8 нм и L-аргинина одновременно на механическую активность кардиомиоцитов и сократимость гладкомышечных клеток (ГМК) воротной вены у крыс линии Вистар с экспериментальной хронической почечной недостаточностью (ХПН) при уровне мочевины крови $13,8 \pm 3,1$ ммоль/л). **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Исследовали влияние НИЛИ и L-аргинина на ГМК воротной вены и кардиомиоциты крыс Вистар с ХПН (резекция 5/6 почечной массы). Механическую активность папиллярной мышцы сердца и сократительную активность воротной вены регистрировали в изометрическом режиме. **РЕЗУЛЬТАТЫ.** Результаты исследования показали, что лазерное облучение и L-аргинин (1,15 ммоль/л) (при любой последовательности воздействия) вызывают дополнительную релаксацию воротной вены контрольных крыс, но не влияют на тонус вены крыс с ХПН, что свидетельствует о снижении активности NO-синтазы в эндотелии воротной вены у крыс с ХПН. Под влиянием НИЛИ и L-аргинина наблюдалось практически полное восстановление механической активности миокарда крыс с ХПН до уровня интактных животных, что свидетельствует о возможности дополнительного синтеза NO в миокарде при увеличении содержания субстрата в инкубационной среде. **ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Результаты сравнительного исследования действия НИЛИ и L-аргинина на миокард и ГМК воротной вены одних и тех же крыс с ХПН-1 показали, что, в отличие от миокарда, эффект НИЛИ и L-аргинина на ГМК воротной вены определяется состоянием сосудистого эндотелия: степенью нарушения обмена L-аргинина и активностью NOS.

Ключевые слова: миокард, механическая активность, гладкомышечные клетки воротной вены, авторитмическая сократительная активность, хроническая почечная недостаточность, низкоинтенсивное лазерное излучение, L-аргинин.

ABSTRACT

THE AIM of the investigation was to compare effects of low-intensity laser radiation (LILR) with wave length 632.8 nm and L-arginine simultaneously on mechanical activity of cardiomyocytes and contractility of smooth muscle cells (SMC) of the portal vein in Wistar rats with experimental chronic renal failure (CRF with the level of blood urea 13.8 ± 3.1 mmol/l). **MATERIAL AND METHODS.** Effects of LILR and L-arginine on SMC of the portal vein and cardiomyocytes of Wistar rats with CRF (resection of 5/6 of kidney mass) were investigated. Mechanical activity of the heart papillary muscle and contractile activity of the portal vein were registered in isometric regimen. **RESULTS.** It was shown that laser irradiation and L-arginine (1.15 mmol/l) (in any succession of exposures) caused additional relaxation of the portal vein of control rats, but failed to influence the vein tone of rats with CRF that is evidence of lower activity of NO-synthase in the portal vein endothelium of rats with CRF. Effects of LILR and L-arginine were followed by practically complete recovery of mechanical activity of the myocardium in CRF rats up to the level of intact animals that suggests a possibility of additional synthesis of NO in the myocardium with increased content of the substrate in the incubation medium. **CONCLUSION.** The results of the comparative investigation of effects of LILR and L-arginine on the myocardium and SMC of the portal vein of the same rats with CRF-1 have shown that, as distinct from myocardium, the effect of LILR and L-arginine on SMC of the portal vein depends on the state of the vascular epithelium: the degree of disturbance of L-arginine metabolism and activity of NOS.

Key words: myocardium, mechanical activity, smooth muscle cells of the portal vein, autorhythmic contractile activity, chronic renal failure, low intensity laser radiation, L-arginine.

ВВЕДЕНИЕ

Нарушение синтеза NO играет ключевую роль в комплексе гемодинамических нарушений, связанных с прогрессированием почечной недостаточности. Длительное угнетение NO-синтазы (NOS)

является одной из причин сердечно-сосудистых нарушений при уремии [1].

У крыс Вистар при удалении 5/6 почечной паренхимы (хирургическая модель хронической почечной недостаточности) снижается общая про-

дукция NO [2], повышается артериальное давление, отмечается гиперактивность ГМК воротной вены [3,4] и увеличивается количество циркулирующих в крови эндотелиоцитов [5]. Механическая активность миокарда при этом меняется двухфазно: гиперактивность миокарда сменяется подавлением его сократимости и нарушением связи частота-сила [6].

Получен ряд данных об участии системы NO-цГМФ в механизме действия He-Ne излучения [7,8]. Так, ранее нами было показано, что блокатор NO-синтазы L-NNA *in vitro* не изменяет установившуюся авторитмическую сократительную активность ГМК воротной вены, но препятствует проявлению эффекта лазерного облучения (как на релаксацию сосудистой стенки, так и на рост амплитуды фазно-тонических сокращений) [9].

Система NO-цГМФ играет важную роль в защите клеток, в том числе ишемизированного миокарда, от избытка Ca^{2+} , [10,11]. В нормальных условиях основной мишенью NO является растворимая гуанилатциклаза. Эффект цГМФ и цГМФ-зависимых протеинкиназ реализуется в активации Ca^{2+} -АТФазы плазматических мембран (ПМ) и саркоплазматического ретикулума (СР) [12,13], гиперполяризации ПМ в результате увеличения калиевой проводимости и снижении при этом входа ионов кальция по потенциалзависимым L-каналам.

При лечении сердечно-сосудистых заболеваний в настоящее время все чаще используется L-аргинин [14,15,16]. Поэтому понятен интерес к исследованию роли дополнительного количества L-аргинина (субстрата для синтеза NO) в эффектах лазерного облучения миокарда и воротной вены у крыс с приобретенной дисфункцией эндотелия. Интерес этот обусловлен также фактом повышения концентрации L-аргинина в крови животных на раннем этапе развития уремии [17], когда уже отмечается дефицит NO и увеличение количества циркулирующих десквамированных эндотелиоцитов, свидетельствующее о повреждении эндотелия.

Учитывая вышеизложенное, бесспорный интерес представляет сравнительное исследование действия НИЛИ на сосудистые гладкомышечные клетки (ГМК) и миокард крыс Вистар при сохранении нормальной функции эндотелия и при нарушении обмена аргинина и синтеза NO у крыс с нефрэктомией.

Поэтому **целью** данной работы стало сравнительное исследование роли NO-синтазной системы в механизме действия гелий-неонового лазера и L-аргинина на сократительную активность сосудистой стенки воротной вены и миокард крыс.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследования выполнялись на фрагментах воротной вены и папиллярных мышцах сердца крыс-самцов линии Вистар (РАН, питомник лабораторных животных Института физиологии им. И.П. Павлова, Колтуши). Животные содержались при неограниченном потреблении корма (стандартный рацион для лабораторных крыс) и воды. Возраст крыс с ХПН на момент проведения опытов на воротной вене 18 недель.

В качестве модели приобретенного нарушения синтеза NO использованы крысы с хронической почечной недостаточностью (ХПН) – резекция 5/6 массы почечной ткани [18,19]. У этих животных нарушена функция NOS и снижена продукция NO в органах и тканях [2]. Контролем служили ложнооперированные животные.

Биохимические анализы крови (содержание мочевины и креатинина) и мочи (содержание альбумина и креатинина) выполнены на биохимическом анализаторе COBAS MIRA. L-аргинин сыворотки определяли спектрофотометрическим методом Сакагучи (спектрофотометр СФ-4 ЛОМО, Санкт-Петербург, Россия).

Регистрация сократительной активности воротной вены производилась в изометрическом режиме с помощью механоэлектрического преобразователя 6 MXIC [20]. Описание деталей эксперимента дано ранее [9].

Измерение кровяного давления осуществлялось непрямой фотоэлектрическим методом. Для оценки повреждения эндотелия был использован метод определения количества циркулирующих эндотелиоцитов [21,22].

Механическую активность папиллярной мышцы исследовали в изометрическом режиме. В качестве измеряемых параметров служили: максимум силы изометрических сокращений (P_0), характерное время расслабления t_{30} [23].

В качестве блокатора синтеза монооксида азота использовали N-нитро-L-аргинин (L-NNA) в концентрации 9,1 ммоль/л (ICN Biomedicals, Inc.).

L-аргинин (ICN Biomedicals, Inc.) добавляли в перфузионный раствор в концентрации 1,15 ммоль/л.

Источник лазерного излучения – ШАТЛ-Комби (He-Ne канал – 632,8 нм); плотность мощности 15 мВт/см², экспозиция 3 минуты для воротной вены и 5 минут для папиллярной мышцы; плотность мощности 15 мВт/см². Луч направлялся на фрагмент сосуда и папиллярную мышцу с расстояния 10 мм.

Статистическая обработка выполнена с использованием пакета многомерного статистического анализа и программы обработки электронных

таблиц Microsoft Excel 7.0 for Windows 95 с применением критериев Стьюдента и Уилкоксона. Все величины, указанные в работе, представлены как средние значения $\pm$ 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-I). Артериальное давление (АД) у крыс с ХПН достигало $135,0 \pm 11,3$ мм рт. ст. (в контроле – $105,2 \pm 9,4$) ($p < 0,01$). В контроле количество циркулирующих эндотелиоцитов составляло $3,2 \pm 0,8 \times 10^4$ /л, а у животных с ХПН – $7,1 \pm 1,9 \times 10^4$ /л ($p < 0,01$).

Содержание в плазме крови L-аргинина у крыс с ХПН было на 40 % выше, чем в контроле ($132,5 \pm 8,2$ мкмоль/л и $94,3 \pm 2,5$ мкмоль/л соответственно, $p < 0,01$).

Влияние L-аргинина и НИЛИ на авторитмическую сократительную активность воротной вены контрольных крыс и крыс с ХПН.

Исходные показатели авторитмической сократительной активности ГМК воротной вены крыс с ХПН превышали контрольные значения. Так, суммарная амплитуда фазно-тонических сокращений и выполняемая веной работа у крыс с ХПН были выше в 1,5 раза ($p < 0,01$) (табл. 1).

При добавлении L-аргинина ($1,15$ ммоль/л) (примерно в 10 раз более высокая концентрация, чем в плазме крови) в среду переживания фрагментов воротной вены контрольных крыс наблюдалась выраженная релаксация сосудистого препарата. К 10-й минуте инкубации снижение базального тонуса достигло $0,224 \pm 0,088$ мН от исходного уровня ($p < 0,01$). Значимых изменений функциональной активности ГМК воротной вены отмечено не было.

На фоне 10-минутного действия L-аргинина проводили 3-минутное облучение воротной вены He-Ne лазером (8 опытов). Во всех опытах в период облучения наблюдалась тенденция к допол-

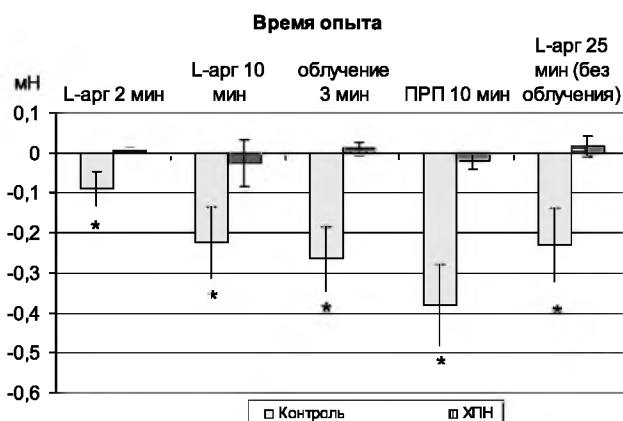


Рис. 1. Влияние L-аргинина ($1,15$ ммоль/л) и 3-минутного лазерного облучения ($632,8$ нм, 15 мВт/см²) на базальный тонус воротной вены контрольных крыс и крыс с ХПН. По оси ординат – изменение базального тонуса от исходного уровня (последняя минута перед добавлением L-аргинина в среду переживания препарата) в мН. * – $p < 0,01$ по сравнению с исходным уровнем.

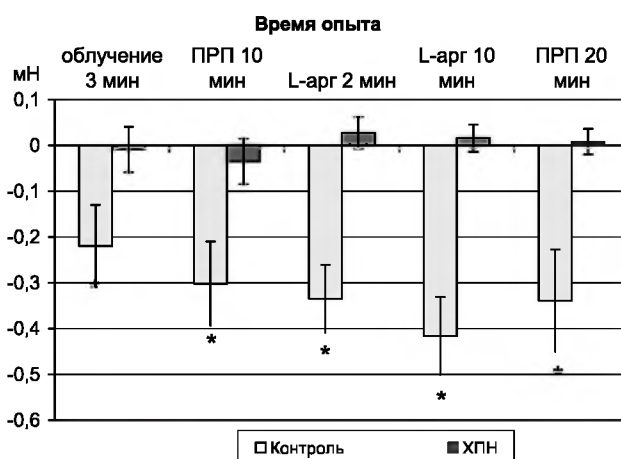


Рис. 2. Влияние 3-минутного лазерного облучения ($632,8$ нм, 15 мВт/см²) и L-аргинина ($1,15$ ммоль/л) на базальный тонус воротной вены контрольных крыс и крыс с ХПН. По оси ординат – изменение базального тонуса от исходного уровня (последняя минута перед началом облучения) в мН. * – $p < 0,01$ по сравнению с исходным уровнем.

нительной релаксации. В пострadiационный период снижение тонуса продолжалось и на 10-й минуте достигало $0,157 \pm 0,066$ мН по сравнению с последней минутой до начала облучения ($p < 0,01$). Таким образом, суммарное снижение тонуса воротной вены к концу опыта составило $0,381 \pm 0,086$ мН. Без облучения (8 опытов) тонус сосуда к этому времени оставался на достигнутом к 10-й минуте инкубации с L-аргонином уровне (рис. 1).

В следующей серии опытов (8 животных) L-аргинин в вышеуказанной концентрации добавляли в среду переживания препарата воротной вены контрольных крыс на 11-й минуте пострadiационного периода после 3-минутного лазерного облучения. В данной серии опытов базальный тонус на 10-й минуте пострadiационного перио-

Таблица 1

Показатели авторитмической сократительной активности ГМК воротной вены контрольных крыс и крыс с ХПН ($\bar{X} \pm m$)

Параметры	Группа животных	
	контроль (n=16)	ХПН-I (n=16)
Частота сокращений за 1 минуту	$14,0 \pm 2,3$	$15,5 \pm 3,6$
Средние значения амплитуды фазно-тонических сокращений, мН	$0,912 \pm 0,166$	$1,340 \pm 0,112^*$
Выполняемая воротной веной работа, условные единицы	$44,8 \pm 8,6$	$68,7 \pm 13,3^*$

Различия достоверны по сравнению с контролем: * – $p < 0,01$.

да был на $0,302 \pm 0,092$ мН ниже исходного ($p < 0,01$). С первых минут после добавления L-аргинина наблюдалась дополнительная релаксация, на 10-й минуте достигавшая $0,114 \pm 0,042$ мг по сравнению с 10-й минутой пострадиационного периода ($p < 0,01$). В данной серии опытов суммарное снижение тонуса воротной вены к концу опыта составило $0,416 \pm 0,093$ мН (рис. 2).

Таким образом, низкоинтенсивное лазерное облучение с длиной волны 632,8 нм и добавление субстрата для синтеза NO дополняли релаксирующий эффект друг друга (рис. 1 и 2).

L-аргинин никоим образом не влиял ни на базальный тонус воротной вены крыс с ХПН, ни на частоту и амплитуду сокращений (8 опытов). Трехминутное лазерное облучение, проведенное на препаратах воротной вены крыс с ХПН после 10 минут инкубации с L-аргинином, также не оказывало действия ни на базальный тонус (рис. 1), ни на характер фазно-тонических сокращений. В пострадиационный период изменений авторитмической сократительной активности воротной вены также не наблюдалось.

В следующей серии (8 опытов), как и в контроле, L-аргинин добавляли в среду переживания препарата воротной вены крыс с ХПН после лазерного облучения. У крыс с ХПН лазерное облучение не изменяло тонус воротной вены ни в период облучения, ни в пострадиационный период. Добавление в перфузионный раствор L-аргинина 11-й минуте пострадиационного периода после 3-минутного лазерного облучения также не приводило к изменениям базального тонуса ГМК воротной вены (рис. 2). Характер фазно-тонических сокращений в данных сериях опытов не изменялся.

Таким образом, добавление в инкубационный раствор дополнительного субстрата для синтеза NO не влияло ни на базальный тонус и характер фазно-тонических сокращений воротной вены крыс с редукцией массы функционирующих нефронов, ни на способность сосудистых ГМК реагировать на низкоинтенсивное лазерное излучение с длиной волны 632,8 нм.

Влияние L-аргинина, L-NNA и НИЛИ на механическую активность миокарда контрольных крыс и крыс с ХПН.

При добавлении L-аргинина в перфузионный раствор (8 опытов) сила изометрических сокращений и скорость расслабления кардиомиоцитов контрольных крыс к 10-й минуте инкубации увеличивалась в среднем на $49,0 \pm 5,2$ % и $10,0 \pm 2,9$ % соответственно. После 10-минутной инкубации папиллярной мышцы в растворе с L-аргинином проводили лазерное облучение. Во всех опытах в пе-

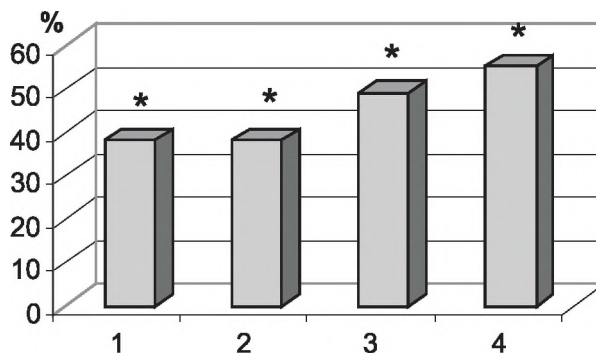


Рис. 3 А

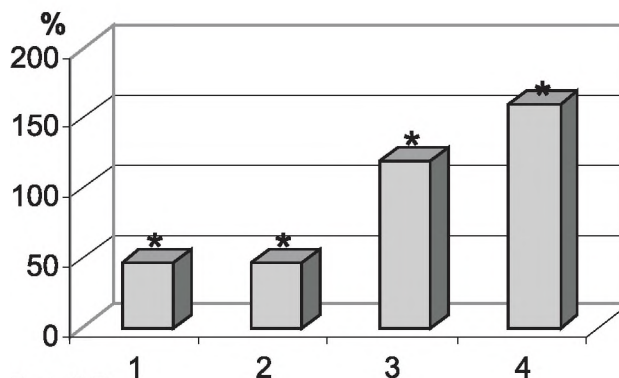


Рис. 3 Б

Рис. 3. Влияние 5-минутного лазерного облучения (632,8 нм, 15 мВт/см²) на силу изометрических сокращений папиллярной мышцы миокарда крыс на фоне действия L-аргинина (0,2 мг/мл) в % к исходному уровню: А – Контрольные животные; Б – Крысы с ХПН; 1 – 10 мин действия L-аргинина; 2 – 5 мин действия лазерного облучения; 3 – 10 мин пострадиационного периода; 4 – 15 мин пострадиационного периода; * – $p < 0,01$ по сравнению с исходным уровнем.

риод 5-минутного облучения He-Ne лазером не наблюдалось дополнительных сдвигов регистрируемых параметров. В пострадиационном периоде 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. 3 А). Таким образом, эффекты действия L-аргинина и НИЛИ суммировались.

В следующей серии (8 опытов) L-аргинин добавляли в перфузионный раствор на 11-16 минутах пострадиационного 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 $60,3 \pm 4,2$ % (рис. 3 Б).

Таким образом, действие НИЛИ и L-аргинина

Влияние L-NNA и лазерного облучения (632,8 нм, 15 мВт/см²) на механическую активность папиллярной мышцы миокарда контрольных крыс (за 100 % приняты исходные значения до добавления в среду переживания препарата L-NNA) ($\bar{X} \pm m$)

Показатели	L-NNA (10-я мин)	Облучение (5-я мин)	Пострадиационный период (10-я мин)
Сила изометрических сокращений, %	93,8±1,7	94,2±2,3	96,2±2,6
Время достижения максимума, %	92,5±3,4	93,2±3,1	95,9±3,5

было однонаправленным и суммарный эффект не зависел от последовательности их влияния и составлял в среднем $57,8 \pm 5,1$ %. Дополнительное введение субстрата для синтеза NO в перфузионный раствор усиливало эффект действия НИЛИ на механическую активность миокарда контрольных крыс.

У крыс с экспериментальной ХПН (8 опытов) регистрировалось снижение силы изометрических сокращений и скорости расслабления по сравнению с контрольными животными. Действие L-аргинина на силу изометрических сокращений крыс

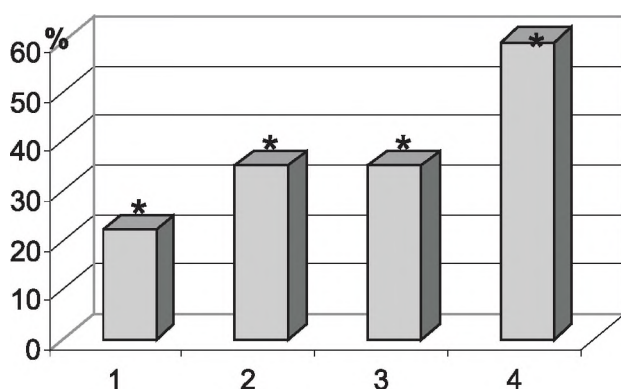


Рис. 4 А

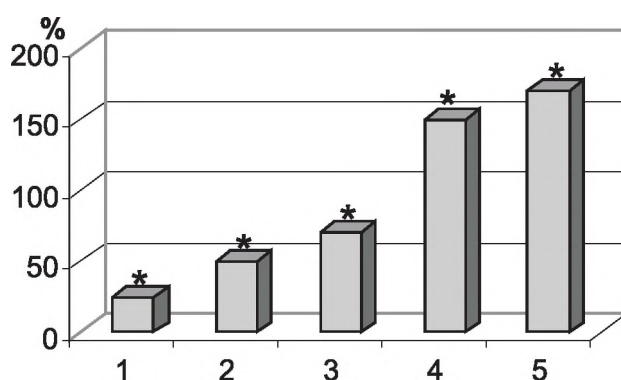


Рис. 4 Б

Рис. 4. Влияние L-аргинина на фоне выраженного действия НИЛИ на силу изометрических сокращений папиллярной мышцы миокарда крыс. А – Контрольные животные; Б – Крысы с ХПН; 1 – 5 мин действия лазерного облучения; 2 – 10 мин пострadiационного периода; 3 – 5 мин действия L-аргинина; 4 – 10 мин действия L-аргинина; * – $p < 0,01$ по сравнению с исходным уровнем.

Таблица 2

с ХПН и контрольных животных было однонаправленным. Однако количественная выраженность эффекта у крыс с ХПН была значительно выше. Сила сокращений миокарда крыс с ХПН под влиянием L-аргинина приближалась к значениям контрольных животных (рис. 4 А). Скорость изо-

метрических сокращений увеличивалась незначительно: t_{30} уменьшалась на 8 – 12 %.

Действие НИЛИ на миокард крыс с ХПН на фоне выраженного эффекта L-аргинина было однонаправленным и усиливало эффект последнего. Однако в 5-минутный период непосредственного облучения дополнительного роста силы изометрических сокращений не наблюдалось, а в пострadiационном периоде отмечалось резкое повышение сократимости – сила сокращений увеличивалась в 2,5 – 3 раза (рис. 4 А). Скорость расслабления при этом 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 крыс с ХПН и приводило к полному восстановлению патологически низкой механической активности миокарда этих животных до уровня контрольных крыс 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.

У контрольных крыс 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 (8 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 L-аргинина на силу изометрических со-

кращений регистрировался только к 10-й минуте перфузии и увеличение P_0 составляло в среднем $59,7 \pm 5,6$ % по сравнению с исходным уровнем (10-15 минутный пострadiационный период – рис. 4 Б). Следующие 15 – 20 минут амплитуда изометрических сокращений не изменялась. Скорость расслабления увеличивалась за весь период наблюдения на $15,4 \pm 2,9$ %. 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 мочевины 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.

При добавлении блокатора NO-синтазы L-NNA в перфузионный раствор наблюдалось незначительное снижение силы изометрических сокращений миокарда контрольных крыс (8 опытов). Облучение He-Ne лазером на фоне действия L-NNA не оказывало никакого влияния на параметры механической активности миокарда (табл. 2), как и в наших предыдущих опытах на воротной вене [9].

ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ результатов исследования суммарного эффекта действия L-аргинина и НИЛИ на активность воротной вены и миокарда крыс с ХПН свидетельствует об исключительной роли эндотелия в действии этих факторов на сосудистые ГМК. Нарушение функции эндотелия, приводящее к снижению образования NO, не компенсируется добавлением субстрата для его синтеза: ни L-аргинин, ни НИЛИ при его высокой концентрации в перфузионном растворе не вызывают снижения тонуса воротной вены крыс с ХПН, в отличие от контрольных животных.

Мы полагаем, что отсутствие релаксации фрагментов воротной вены крыс с экспериментальной уремией при действии НИЛИ связано с неспособностью эндотелиоцитов вырабатывать достаточное для этого количество NO. Это предположение основано на том, что хирургическая модель ХПН одновременно является и моделью системной дисфункции эндотелия [24]. О системном повреждении эндотелия у наших крыс с ХПН свидетельству-

ет повышение числа циркулирующих в крови десквамированных эндотелиоцитов.

NO играет важную роль в механизме гемодинамических нарушений, связанных с почечной патологией [25,26]. В наших опытах мы наблюдали у крыс с ХПН рост АД и одновременно – повышенную концентрацию аргинина в плазме крови. Накопление аргинина в плазме при хирургической модели ХПН связывают с нарушением его метаболизма [17].

Основной путь утилизации аргинина – орнитинный цикл Кребса. Второй по значимости путь утилизации аргинина заключается в превращении последнего в цитруллин. В случае торможения орнитинового цикла следует ожидать увеличения утилизации аргинина с генерацией цитруллина в NO-синтазной реакции. У крыс после резекции 5/6 почечной массы снижается экспрессия всех изоформ NO-синтазы и выработка NO [1,2], но повышается содержание цитруллина в плазме [17]. В таком случае, если различные виды NO-синтазной активности не повышены, другим логичным объяснением накопления цитруллина может быть угнетение метаболической функции почки. Как известно, регенерация аргинина из цитрулина происходит именно в почках [27].

Снижение синтеза аргинина в почках при прогрессирующем снижении их метаболической функции может быть компенсировано снижением превращения аргинина в орнитин аргиназой, которая в изобилии присутствует в почках [27]. Гипертрофия проксимальных канальцев оставшихся нефронов увеличивает их аргинин-синтазную емкость, гиперфильтрация увеличивает порцию проходящего через них цитруллина и повышенная концентрация цитруллина в плазме способствует сохранению почечного синтеза аргинина [17]. Кроме того, повышение концентрации мочевины в крови у крыс с нефрэктомией и по принципу обратной связи может подавлять превращение L-аргинина в печени в орнитинном цикле [28].

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. Инкубация фрагментов воротной вены нефрэктомизированных животных с L-аргинином не сопровождалась релаксацией или восстановлением чувствительности к действию НИЛИ. Следовательно использование L-аргинина для синтеза NO в воротной вене было резко ограничено.

Иначе ведет себя миокард этих животных. 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 ответа на L-аргинин и НИЛИ. Более того, действие НИЛИ на миокард этих животных превышает его эффект, зарегистрированный у контрольных крыс. 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 [29]. 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 [30,31].

Таким образом, реакция миокардиальных клеток и ГМК на НИЛИ и L-аргинин у одних и тех же крыс не совпадает. Гиперактивность сосудистых ГМК у крыс с ХПН-1 регистрируется наряду со снижением механической активности миокарда. Снижение сократимости кардиомиоцитов у экспериментальных животных естественно рассматривается как переход во вторую фазу функциональных изменений, характерных для развития ХПН-П. 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 10-кратном 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 в миокарде синтез необходимого количества NO и кардиопептидов [29,32].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты сравнительного исследования действия НИЛИ и L-аргинина на миокард и ГМК воротной вены одних и тех же крыс с ХПН-1 показали, что, в отличие от миокарда, эффект НИЛИ и L-аргинина на ГМК воротной вены определяется состоянием сосудистого эндотелия: степенью нарушения обмена L-аргинина и работой NOS.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Vaziri ND. Effect of cronic renal failure on nitric oxide metabolism. *Am J Kidney Dis* 2001; 38 [4 Suppl 1]: S74-S79
2. Kim SW, Lee J, Paek YW et al. Decreased nitric oxide synthesis in rats with chronic renal failure. *J Korean Med Sci* 2000; 15 (4): 425-430
3. Барабанова ВВ, Береснева ОН, Мирошниченко ЕЛ и др. Функциональная активность воротной вены как отражение метаболических изменений при экспериментальной хронической почечной недостаточности. *Физиол Журн СССР им. И. М. Сеченова* 1993; 79 (1): 64-72
4. Potter GS, Johnson RJ, Fink GD. Role of endothelin in hypertension of experimental chronic renal failure. *Hypertension* 1997; 30 (6): 1578-1584
5. Барабанова ВВ, Чефу СГ. Действие низкоинтенсивного лазерного излучения ($\lambda=632,8$ нм, плотность мощности 15 мВт/см²) на функциональную активность сосудистых гладкомышечных клеток воротной вены и миокард крыс с экспериментальной хронической почечной недостаточностью. *Нефрология* 2003; 7 (Прил 1): 139-140
6. Барабанова ТА, Пенчул НА. Экспериментальная хроническая почечная недостаточность, фуросемид и сократимость миокарда. *Нефрология* 1998; 2(3): 80-84
7. Петрищев НН, Смирнов АВ, Барабанова ВВ и др. Действие низкоинтенсивного лазерного излучения с длиной волны 632, 8 нм на сердечно-сосудистую систему крыс с экспериментальной хронической почечной недостаточностью. *Нефрология* 2004; 8 (Прил 2): 282
8. Brill AG, Brill GE, Shenkman B et al. Low power laser irradiation of blood inhibits platelet function: role of cyclic GMP. *SPIE* 1998; 3569: 4-9
9. 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
10. Барила ГГ. Некоторые клинические и биохимические данные эффективности лечения больных ишемической болезнью сердца лучами лазера. II съезд кардиологов УССР. Тезисы докладов. Киев, 1983: 30-31
11. Реутов ВП, Сорокина ЕГ, Охотин ВЕ, Косицин НС. Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих. Наука, М., 1998
12. Веренинов АА, Марахова ИИ. Транспорт ионов у клеток в культуре. Наука, М., 1986
13. Lincoln TM, Komalavilas P, Cornwell TL. Pleiotropic regulation of vascular smooth muscle tone by cyclic GMP-dependent protein kinase. *Hypertension* 1994; 23 (6 Pt 2): 1141-1147
14. Efron DT, Barbul A. Arginine and nutrition in renal disease. *J Ren Nutr* 1999; 9(3):142-144
15. 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
16. Wu G, Meininger CJ. Arginine nutrition and cardiovascular function. *J Nutr* 2000; 130(11): 2626-2629
17. 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
18. Harris C, Meyer TW, Brenner BM. Nephron adaptation to renal injury. The kidney. Philadelphia, London, Tokio, 1986: 1555-1565
19. Ormrod D, Miller T. Experimental uremia. *Nephron* 1980; 26 (5): 249-254
20. Блаттнер Р, Классен Х, Денерт Х, Деринг Х. Эксперименты на изолированных препаратах гладких мышц: пер. с англ. Мир, М, 1983
21. Hladovec J, Prerovsky I, Stanec V, Fabian J. Circulating endothelial cells in acute myocardial infarction and angina pectoris. *Klin Wochenshr* 1978; 56: 1033-1036
22. Петрищев НН, Беркевич ОА, Власов ТД и др. Диагностическая ценность определения десквамированных эндотелиальных клеток в крови. *Клинич Лаб Диагностика* 2001; (1): 50-52

23. Барабанова ТА, Петрищев НН, Смирнов АВ. Влияние излучения He-Ne лазера на механическую активность миокарда крыс при экспериментальной хронической почечной недостаточности. *Нефрология* 2003; 7 (1): 91-97
24. Vaziri ND, Ni Z, Oveisi F et al. Enhanced nitric oxide inactivation and protein nitration by reactive oxygen species in renal insufficiency. *Hypertension* 2002; 39 (1): 135-141
25. Шестакова МВ, Кутырина ИМ, Рагозин АК. Роль сосудистого эндотелия в регуляции почечной гемодинамики. *Тер Арх* 1994; 66 (2): 83-86
26. Aiello S, Noris M, Remuzzi G, Mario Negri. Nitric oxide/L-arginine in uremia. *Miner Electrolyte Metab* 1999; 25(4-6): 384-390
27. Dhanakoti SN, Brosnan JT, Herzberg GR, Brosnan ME. Renal arginine synthesis: studies in vitro and in vivo. *Am J Physiol* 1990; 259(3 Pt 1): E437-E442
28. Mora J, Martuscelli J, Ortiz Pineda J, Soberon G. The regulation of urea-biosynthesis enzymes in vertebrates. *Biochem J* 1965; 96:28-35
29. 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; 136(3): 1241-1249
30. 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
31. 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
32. Lang RE, Thocken H, Gauten D. Atrial natriuretic factor – circulating hormone stimulated by volume loading. *Nature* 1985; 314: 264-266

Поступила в редакцию 21.09.2007 г.

Принята в печать 12.11.2007 г.