

С.М. Федоров, О.В. Базілюк, А.В. Коцюрuba, Ю.П. Коркач, В.Ф.Сагач

Магнітолазерний вплив на систему оксиду азоту і скоротливу активність гладеньких м'язів аорти при артеріальній гіпертензії

Дослідження проведене на трьох групах щурів: I – щури лінії Вістар з нормальним тиском (перша контрольна група); II – щури з генетично детермінованою гіпертензією (друга контрольна група); III – щури з генетично детермінованою гіпертензією під магнітолазерним впливом (основна група). Для низькоінтенсивного магнітолазерного впливу використовувався апарат МІТ-МТ (Україна), що призначений для лікування низькочастотним магнітним полем з використанням оптичного потоку синього і червоного діапазону спектра. Тривалість впливу на тварин: 15 хв для синього діапазону і 25 хв для червоного діапазону. Біохімічні дослідження включали визначення активності ізоферментів NO-синтаз: конститутивну (cNOS) та індукційну (iNOS), вміст вільного гемоглобіну, стабільних метаболітів NO, а саме нітрит- (NO_2^-) і нітрат (NO_3^-)-аніонів, стійкість еритроцитів до кислотного гемолізу. Фізіологічна методика полягала в реєструванні скоротливої активності гладеньких м'язів аорти. Встановлено, що магнітолазерний вплив на щурів з генетично детермінованою гіпертензією як при червоному (довжина хвилі 630 нм), так і при синьому (довжина хвилі 470 нм) оптичному діапазоні спектра навіть при одноразовому використанні призводить до збільшення синтезу оксиду азоту в плазмі крові. Отримані нами результати свідчать, що найбільш ефективним в інтенсифікації ендogenous синтезу оксиду азоту (підвищення вмісту NO_2^- і зменшення NO_3^-), а також в ендотеліязалежній реакції розслаблення гладеньких м'язів аорти у щурів з генетично детермінованою гіпертензією на ацетилхолін виявився десятидобовий курс проведення магнітолазерного впливу в оптичному потоці синього діапазону спектра. Також після 10 сеансів магнітолазерного впливу вищезгаданим спектром відбувається стабілізація мембран еритроцитів.

Ключові слова: магнітолазерний вплив, оксид азоту, гладенькі м'язи аорти, стабілізація мембран еритроцитів, артеріальна гіпертензія.

ВСТУП

Провідне місце в патогенезі артеріальної гіпертензії займає функціональний стан ендотелію судин, особливо має його синтезуюча функція, яка проявляється у вивільненні вазоактивних речовин [14]. Одним із вазодилататорних факторів є оксид азоту (NO) [7, 11, 13, 25]. Порушення фізіологічної концентрації цього потужного трансмітера відіграє важливу роль у механізмах ініціації та прогресуванні ендотеліальної дисфункції [6, 9]. Дисфункція ендотелію – це дисбаланс системи локальної регуляції гомеостазу і судинного тонуусу [7, 10, 16, 27].

Ціла низка публікацій вказує на позитивний вплив медикаментозної корекції функціонального стану ендотелію у хворих на серцево-судинну патологію [7, 15]. Разом з тим зустрічаються тільки поодинокі та несистематизовані експериментальні та клінічні роботи з вивчення впливу фізичних чинників у тому числі низькоінтенсивного лазерного освітлення (НІЛО) і магнітного поля (МП) на функцію ендотелію при серцево-судинних захворюваннях [1, 8, 14].

Доведена здатність НІЛО активувати NO-синтезуючу функцію ендотелію судин, покращувати процеси мікроциркуляції та змінювати деякі показники гемореології у хворих на

© С.М. Федоров, О.В. Базілюк, А.В. Коцюрuba, Ю.П. Коркач, В.Ф.Сагач

стенокардію [8]. Дослідження Лапшиної та співав. [14] показали, що під впливом НІЛО інфрачервоного діапазону на корпоральні, аурікулярні точки акупунктури та паравертбральні зони у пацієнтів з артеріальною гіпертензією знижувався вміст ендотеліну-1 і підвищувався синтез NO внаслідок активації індукційної NO-синтази. Клінічні дослідження інших авторів [1] вказують на те, що комплексна магнітотерапія позитивно впливає на чутливість ендотеліальних клітин артерій та їх здатності до вазодилатації. Зараз все частіше в клінічній практиці застосовується поєднання фізичних чинників, наприклад, комбінація МП з НІЛО червоного, синього, інфрачервоного діапазонів має назву магнітолазерної терапії (МЛТ). Одночасна дія всіх зазначених діапазонів і МП викликає додаткові фізичні ефекти, які сприяють збільшенню лазерного потоку та більш активному засвоєнню енергії НІЛО організмом [2, 5, 21]. Незважаючи на це, експериментальних досліджень щодо комбінованого впливу НІЛО та МП на функцію ендотелію судин при артеріальній гіпертензії не проводилося.

Метою нашої роботи було дослідження ефективності використання магнітолазерного впливу низької інтенсивності червоного і синього діапазонів спектра для корекції дисфункції ендотелію при артеріальній гіпертензії.

МЕТОДИКА

Експериментальні дослідження виконані у відповідності до положень Конвенції з біоетики Ради Європи (1997), Гельсінської декларації Всесвітньої Медичної Асоціації (1996), Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986), загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (вересень, 2001), інших міжнародних угод та національного законодавства у цій галузі.

Дослідження проведено на трьох групах щурів: I – щури лінії Вістар з нормальним тиском (1-ша контрольна група); II – щури з генетично детермінованою гіпертензією – ЩГДГ – (друга контрольна група); III – ЩГДГ під магнітолазерним впливом червоного і синього діапазонів спектра (основна група).

Фізіологічні дослідження

Для низькоінтенсивного магнітолазерного впливу (МЛВ) використовували апарат МІТ-МТ (Україна), який призначений для лікування низькочастотним МП з використанням оптичного потоку синього і червоного діапазону спектра. Дозу освітлення тварин визначали за стандартною схемою [20]. Параметри МЛВ: тривалість 15 та 25 хв, частота модуляції сигналу 10 Гц, інтенсивність 9 од. Щільність потужності синього (довжина хвилі 470 нм) і червоного (довжина хвилі 630 нм) діапазону спектра 5 і 10 мВт/см². Магнітна індукція на поверхні індуктора синього і червоного діапазону 9 та 7 мТл. Зоною МЛВ були судини основи хвоста. Проведено 1, 5 і 10 сеансів освітлення обома діапазонами спектра.

Відразу після МЛВ тварин декапітували, вилучали грудну ділянку аорти і кров. Судину нарізали під кутом 45° на кільцеві препарати масою 1–2 мг. Такий препарат розташовували в проточній, термостатованій (35–36°C) камері, яку перфузували стандартним буферним розчином Кребса, і розтягували з силою 7–10 мН у режимі, котрий наближався до ізотонічного. Реєстрували скоротливу активність гладеньких м'язів (ГМ) аорти за методикою, описаною нами раніше [30]. Для дослідження впливу вазодилаторних агоністів ГМ попередньо активували, додаванням у розчин Кребса норадреналіну (НА, 10⁻⁶ моль/л). При цьому рівень скорочення ГМ приймали за 100 %, від якого проводили подальші розрахунки змін амплітуди реакцій на ендотеліозалежний (ацетилхолін йодид, АХ, 10⁻⁶ моль/л) і ендотелінезалежний (нітропрурид натрію (НП), 10⁻⁴ моль/л, «Sigma» США) агоністи.

Біохімічні дослідження

Кров розділяли на збагачену лейкоцитами плазму і еритроцити. В отриманій плазмі досліджували активність ізоферментів NO-синтаз: конститутивну (сNOS) та індукцибельну (іNOS), вміст вільного гемоглобіну, стабільних метаболітів NO, а саме нітрит- (NO_2^-) і нітрат- (NO_3^-) аніонів. Активність ферментів визначали за утворенням цитруліну в інкубаційному середовищі, яке містило катіони кальцію (для сNOS), або готувалося без них (для іNOS).

Вміст NO_2^- визначали в безбілкових аліквотах проб у колориметричній реакції за допомогою реактиву Гріса методом Гріна. Реактив Гріса готували, змішуючи рівні частини 0,1%-го водного розчину нафтилетилендіаміндігидрохлориду («Sigma», США) з 1%-м розчином сульфаніламіну («Sigma», США) в 5% H_3PO_4 безпосередньо перед вимірюваннями. Вміст NO_3^- досліджували спектрофотометричним методом. Аліквоти проб інкубували при 100°C протягом 10 хв із розчином бруцину, охолоджували і реєстрували екстинцію при 405 нм. Концентрацію нітрит- і нітрат-аніонів визначали за допомогою калібрувальної кривої з використанням NaNO_2 і NaNO_3 відповідно.

Вміст вільного, нееритроцитарного гемоглобіну досліджували в плазмі крові спектрофотометричним методом при довжині хвилі 640 нм, стійкість еритроцитів до кислотного гемолізу – за оригінальним методом Терскова [23].

Результати досліджень оброблено методом варіаційної статистики за допомогою програмного забезпечення Origin 6.0 фірми «Microcal Software, Inc.» (США).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ*Фізіологічні дослідження*

У тварин з нормальним рівнем артеріального тиску (1-ша контрольна група) АХ викликав ендотелійзалежне розслаблення ГМ з амплітудою $66,3\% \pm 3,0\%$, НП – ендотелійнезалежне розслаблення з амплітудою $87,4\% \pm 2,4\%$.

Численними дослідженнями, в тому числі і нашими, встановлено, що при артеріальній гіпертензії ГМ судин повністю не втрачають здатності до розслаблення, в основному, за рахунок збереження ендотелійнезалежного розслаблення [4, 18, 28]. Дефіцит одного з найпотужніших вазодилататорів – оксиду азоту, що спостерігається у щурів з генетично детермінованою артеріальною гіпертензією (2-га контрольна група), приводить до ушкодження NO-залежного компонента регуляції тону судин і значного підвищення системного артеріального тиску (рис. 1). Використання широкого спектра медикаментозних засобів поки-що не призвело до значного покращення ситуації в клінічній практиці, профілактиці і лікуванні артеріальної гіпертензії, тому на часі пошуки нових методів і засобів корекції цієї розповсюдженої у світі, в тому числі і в Україні, хвороби.

Нами встановлено, що одноразовий МЛВ синім діапазоном спектра на судини ЩГДГ тривалістю 15 хв не викликав АХ-індукованої (залежної від оксиду азоту) реакції. Водночас за дії НП реєструвалося ендотелійнезалежне розслаблення з амплітудою всього 32,9 %, тобто при цьому режимі МЛВ ендотелійнезалежне розслаблення значно інгібується. Аналогічні результати ми отримали і після червоного МЛВ тривалістю 25 хв. Проте після освітлення судинного препарату безпосередньо у перфузійній камері тривалістю 40 хв розслаблення на АХ з'являлося і становило в середньому 12,5 %, а на НП – 88,2 %, тобто ендотелійнезалежне розслаблення було вже на рівні 1-ї контрольної групи щурів.

Після п'ятиразового МЛВ червоним діапазоном спектра тривалістю 25 хв АХ викликав розслаблення з амплітудою в середньому 13 %, яке після додаткового освітлення безпосередньо у перфузійній камері протягом 40 хв збільшувалося до 19,6 %. При цьому ендотелійнезалежне розслаблення на НП становило 100 %, що перевищувало вихідний рівень (до МЛВ – $87,4\% \pm 2,4\%$). Після МЛВ синім діапазоном на основну

групу щурів тривалістю 15 хв реакція на АХ не реєструвалася, а після додаткового освітлення судинних смужок у перфузійній камері (40 хв) розслаблення з'являлося і становило в середньому 15,2 %, ендотелійнезалежне розслаблення у відповідь на НП було з амплітудою 100 %, що перевищувало рівень 2-ї контрольної групи.

Після десятиразового МЛВ червоним діапазоном основної групи щурів тривалістю 25 хв (n=4) ендотелійзалежне розслаблення на АХ (44 %) зареєстрували лише в одному препараті, в той час як ендотелійнезалежне розслаблення становило в середньому 70,9 %, що було дещо нижче від його рівня у 2-ї контрольної групи.

В основній групі щурів після десятиразового МЛВ червоним діапазоном протягом 25 хв (n=4) реакція на АХ не реєструвалася лише у 2 дослідях, а у решти спостерігалось невелике розслаблення або двофазна констрикторно-дилаторна реакція з амплітудою останньої 100 %. При цьому ендотелійнезалежне розслаблення було з амплітудою 100% (див. рис. 1).

Збільшення тривалості МЛВ у ЩГДГ до 30 хв виявило таку картину. Ні при червоному, ні при синьому МЛВ ендотелійзалежна

АХ-індукована реакція не реєструвалася, а ендотелійнезалежна була амплітудою трохи нижчою від вихідного рівня (75,5%) після червоного МЛВ і, навпаки, значно його перевищувало (126%) після тривалого синього МЛВ.

Біохімічні дослідження

Встановлено, що активність Ca^{2+} -залежної NOS (сNOS) у плазмі крові 2-ї контрольної групи майже в 5 разів нижча ($4,43 \pm 0,67$) $\text{пмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка, ніж у щурів з нормальним тиском ($22,03 \pm 2,39$) $\text{пмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка. Власне, низька активність сNOS у ЩГДГ зумовлена генетично, тоді як активність Ca^{2+} -незалежної NOS (іNOS), навпаки, була достовірно вищою ($37,42 \pm 5,37$) $\text{пмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка від норми ($20,74 \pm 1,21$) $\text{пмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка.

У табл. 1 представлено результати МЛВ низької інтенсивності на активність ферментів синтезу оксиду азоту в збагаченій лейкоцитами плазмі крові. Після одноразового низькоінтенсивного МЛВ червоного діапазону спектра активність сNOS достовірно знижувалась. Однак уже після 5 сеансів освітлення цей показник повертався до значення в 2-й контрольній групі, але й навіть після 10 сеансів був в 4,4 раза нижчим за значення в 1-й контрольній групі. Варто зазначити, що

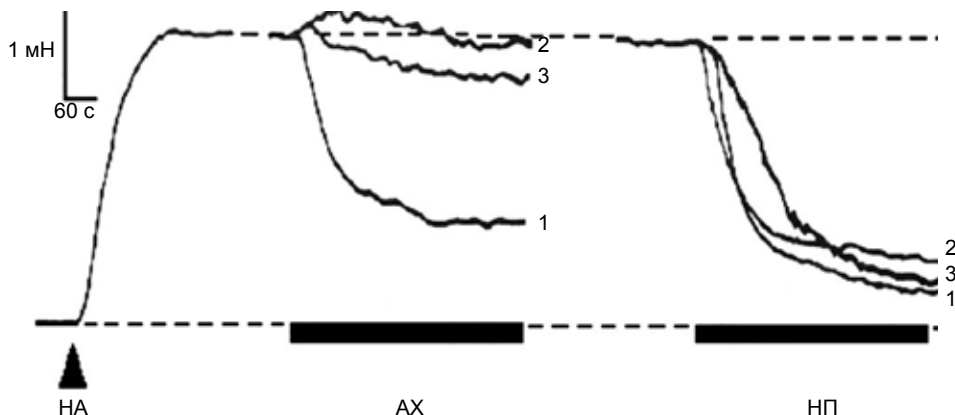


Рис. 1. Зміни ацетилхолін- (АХ) та нітропрусид (НП)-скорочувальних реакцій преактивованих норадреналіном (НА) гладеньких м'язів (ГМ) грудної аорти в щурів першої контрольної групи (1), другої контрольної групи (2), і у щурів основної групи під магнітолазерним впливом синім діапазоном спектра (3). Темна лінія під кривими – тривалість впливу агоністів (АХ- 10^{-6} моль/л, НП- 10^{-4} моль/л) ГМ. Стрілкою позначено початок активації (НА- 10^{-5} моль/л). Переривчаста лінія – дає вихідний (внизу) рівень тонічного напруження ГМ і заданий (зверху) рівень їх активації після введення НА, що приймається за 100%. МЛВ синього діапазону спектра: тривалість-15 хв, частота-10 Гц, інтенсивність-9

Таблиця 1. Активність NO-синтаз (пмоль·хв⁻¹·мг⁻¹білка) у плазмі крові основної групи щурів після магнітолазерного впливу (МЛВ) різного діапазону спектра

Кількість сеансів МЛВ	NO-синтаза			
	конститутивна		індуцибельна	
	МЛВ червоним діапазоном спектра	МЛВ синім діапазоном спектра	МЛВ червоним діапазоном спектра	МЛВ синім діапазоном спектра
1 сеанс	1,98±0,44 **	4,60±1,40*	8,75±0,66 ***	8,88±0,42 ***
5 сеансів	3,98±0,33*	5,42±3,12*	9,05±0,39 ***	8,32±0,51 ***
10 сеансів	5,12±0,5*	5,31±0,81*	9,02±0,22 */**	8,15±0,33 ***

Примітка: у табл. 1 і 2 *P<0,05 – достовірно відносно 1-ї контрольної групи щурів; **P<0,05 – достовірно відносно 2-ї контрольної групи щурів.

у ЩГДГ порушено експресію eNOS, тому ні одноразовий, ні багаторазовий МЛВ не в змозі був стимулювати активність Ca²⁺-залежного de novo синтезу NO.

Незважаючи на підвищену в 1,5 раза активність iNOS у плазмі 2-ї контрольної групи (37,42±5,37 пмоль·хв⁻¹·мг⁻¹білка) порівняно з 1-ю контрольною групою щурів (20,74±1,21 пмоль·хв⁻¹·мг⁻¹білка), ендотелійзалежні реакції розслаблення судин у цих тварин були майже повністю порушені і практично не відновлювалися після МЛВ обох діапазонів спектра, навіть при значному зниженні активності цього ферменту (див. табл. 1). Це підтверджує функційну неактивність синтезованого de novo NO iNOS для розслаблення ГМ судин.

При дослідженні вмісту вільного (нееритроцитарного) гемоглобіну у плазмі ЩГДГ виявилось, що його рівень був достовірно вищим (0,365 мг/мл ± 0,031 мг/мл щодо 0,252 мг/мл ± 0,036 мг/мл у 1-й контрольній групі). Це вказує на більшу ймовірність «деактивації» NO в плазмі крові щурів 2-ї контрольної групи, за допомогою його ферментативного окиснення оксигемоглобіну до нітрат-аніона. Ця можливість посилювалася достовірним підвищенням вмісту гемоглобіну до 0,599 мг/мл ± 0,086 мг/мл після одноразового червоного МЛВ і, навпаки, зменшувалася при достовірному зниженні цього показника до 0,268 мг/мл ± 0,024 мг/мл після 10 сеансів синього МЛВ.

Позаяк вільний гемоглобін вивільнюється з еритроцитів лише при руйнуванні плазматичної мембрани еритроцитів в процесі гемолізу (некрозу еритроцитів), ми дослідили дію МЛВ на кислотний гемоліз еритроцитів у ЩГДГ. Результати цього дослідження представлено в табл. 2. Хоча індекси стійкості (інтегральний показник, що враховує тривалість і відсоток гемолізу на всьому періоді гемолітичного процесу) еритроцитів 1-ї контрольної групи (556,6 ум.од. ± 45,6 ум.од.) і 2-ї контрольної групи (434,0 ум.од. ± 43,7 ум.од.) достовірно не відрізнялися між собою, ми спостерігали значні відмінності в частці лабільних (таких, що дуже швидко гемолізуються, менше ніж 2,5 хв) і стабільних (таких, що гемолізуються повільно, понад 7,5 хв) популяцій еритроцитів у плазмі крові цих груп. Так, частка лабільних клітин у плазмі ЩГДГ (8,69±0,64) була в 7 разів вищою, ніж у 1-й контрольній групі (1,21±0,34). Частка стабільних клітин, навпаки, була у 20 разів нижчою у 2-й контрольній групі (0,27±0,05) порівняно зі щурами з нормальним тиском (5,59±0,70).

Значні відмінності в МЛВ низької інтенсивності синього і червоного діапазону спектра ми спостерігали вже після одноразового освітлення. Так, при МЛВ червоного діапазону спектра індекс стійкості еритроцитів зменшувався майже вдвічі. Це вказує на значне посилення кислотного гемолізу еритроцитів за дії червоного діапазону спектра. Після 5 і 10 сеансів МЛВ обох спектральних діапазонів

Таблиця 2. Показники кислотного гемолізу еритроцитів крові після магнітолазерного впливу (МЛВ) різного діапазону спектра

Кількість сеансів МЛВ	Індекс стійкості,		Частка еритроцитів, %			
	ум. од		лабільних		стабільних	
	МЛВ червоним діапазоном спектра	МЛВ синім діапазоном спектра	МЛВ червоним діапазоном спектра	МЛВ синім діапазоном спектра	МЛВ червоним діапазоном спектра	МЛВ синім діапазоном спектра
1 сеанс	233,2±61,0***	394,2±9,7	38,38±15,02***	9,55±4,84*	2,04±1,22***	2,22±0,21***
5 сеансів	436,5±40,6	457,2±99,0	5,07±1,87*	4,16±1,77***	4,07±1,66**	4,36±1,61**
10 сеансів	577,7±48,6	597,6±8,6	4,10±1,25***	2,47±0,68***	8,16±3,97**	11,64±4,34***

цей показник повністю нормалізувався і дещо перевищував значення в 1-й групі контролю.

Частка лабільних клітин після одноразового освітлення червоним діапазоном спектра зростала більш ніж у 4 рази. Після 5 сеансів МЛВ цей показник повернувся до рівня 2-ї контрольної групи, а вже після 10 сеансів був удвічі нижчим за значення у ЩГДГ. При освітленні синім діапазоном спектра таке дворазове зниження частки лабільних еритроцитів відбувалося вже після 5-го сеансу. А після 10-го значення цього показника було в 3,5 рази нижчим, ніж у 2-й контрольній групі (див. табл. 2).

Частка стабільних еритроцитів, яка була дуже низькою у ЩГДГ, вже після першого сеансу МЛВ обох досліджуваних діапазонів спектра підвищувалася у 10 разів (див. табл. 2). Після 5 сеансів цей показник сягнув рівня 1-ї контрольної групи, а вже після 10 сеансів МЛВ синім діапазоном спектра достовірно його перевищувала. Ці результати вказують на дестабілізацію плазматичних мембран еритроцитів ЩГДГ за одноразового МЛВ червоним діапазоном спектра і, навпаки, стабілізацію після 10 сеансів МЛВ синім діапазоном спектра. Останнє може бути зумовлене збільшенням кількості молодих клітин (активацією еритропоезу) на противагу швидкому «старінню» еритроцитів за одноразового МЛВ червоним діапазоном спектра (630 нм), яке близьке до другого максимуму поглинання світла гемоглобіном еритроцитів (500–600 нм). Цікаво, що МЛВ

синім діапазоном спектра (470 нм) попадає на перший максимум поглинання світла гемоглобіном еритроцитів (450–500 нм).

Встановлено, що у плазмі крові щурів 1-ї контрольної групи вміст NO_2^- і NO_3^- становив (274,3±20,9) $\mu\text{моль/мг}$ білка і (16,6±1,5) $\mu\text{моль/мг}$ білка відповідно. У плазмі щурів другої контрольної групи вміст NO_2^- значно знижувався і становив (129,46±23,5) $\mu\text{моль/мг}$ білка, а вміст NO_3^- дещо підвищився до (19,31±5,69) $\mu\text{моль/мг}$ білка (рис. 2). Отже, при гіпертензії в плазмі вміст нітрит-аніона, як маркера біодоступності NO, знижується майже вдвічі, а нітрат-аніона, як маркера інтенсивності утворення і деградації пероксинітриту, зростає у 1,2 рази.

Після одноразового МЛВ червоним діапазоном спектра ЩГДГ тривалістю 25 хв ($n=7$) вміст NO_2^- збільшувався в 1,6 рази, а вміст NO_3^- – в 1,3 рази (див. рис. 2). Після п'ятиразового МЛВ червоним діапазоном спектра спостерігали більш значні зміни пулів циркулюючих стабільних метаболітів оксиду азоту: вміст NO_2^- збільшився у 3,4 рази, а вміст NO_3^- – у 3,1 рази. При десятиразовому МЛВ червоним діапазоном спектра вміст NO_2^- зростав всього у 1,4 рази, тоді як вміст NO_3^- , навпаки, зменшувався у 2,3 рази (див. рис. 2).

У разі одноразового МЛВ ЩГДГ із використанням синього діапазону спектра тривалістю 15 хв, вміст NO_2^- збільшувався в 3,1 рази, а NO_3^- у 1,9 рази в порівнянні з 2-ю контрольною групою (рис. 3). При

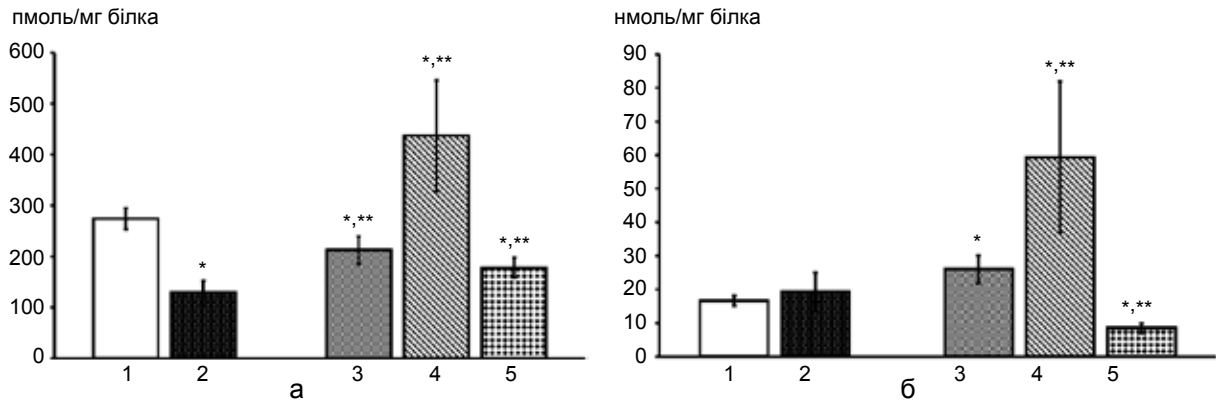


Рис. 2. Зміни вмісту NO₂⁻ (а) і NO₃⁻ (б) у плазмі щурів першої контрольної групи (1), другої контрольної групи (2) та у основної групи при магнітолазерному впливі червоним діапазоном спектра (тривалість 25 хв, інтенсивність 9, частота 10 Гц) упродовж: одного (3), п'яти (4) і десяти (5) сеансів. *P<0,05 – достовірно відносно першої контрольної групи щурів; **P<0,05 – достовірно відносно другої контрольної групи щурів

п'ятиразовому МЛВ зміни вмісту стабільних метаболітів оксиду азоту були ще більшими: вміст NO₂⁻ і NO₃⁻ збільшували у 3,3 і 2,6 рази. При десятиразовому МЛВ вміст NO₂⁻ зріс у 4,2 рази, в той час як пули NO₃⁻ зменшувалися у 1,3 рази (P<0,05; див. рис. 3).

За умов десятиразового освітлення щурів основної групи і збільшення тривалості МЛВ до 30 хв червоним діапазоном спектра підвищувався відносно 2-ї контрольної групи вміст NO₂⁻ в плазмі у 2,5 рази, а NO₃⁻ майже вдвічі. Після МЛВ синім діапазоном спектра вміст NO₂⁻ підвищувався у 1,9 рази, а NO₃⁻ у 1,6 рази (рис.4).

Отже, аналіз отриманих результатів свідчить про МЛВ на плазму щурів з генетично детермінованою гіпертензією як при червоному (довжина хвилі 630 нм), так і при синьому (довжина хвилі 470 нм) оптичному діапазоні. Навіть одноразовий МЛВ викликає інтенсифікацію синтезу оксиду азоту, про що говорить збільшення циркулюючих пулів його стабільних метаболітів – NO₂⁻ і NO₃⁻. Підвищення синтезу оксиду азоту під впливом лазерного освітлення, на думку Борисенка та співавт. [3], є результатом вивільнення NO із нітрозильних комплексів гемопротеїнів. Найбільш ефективним щодо

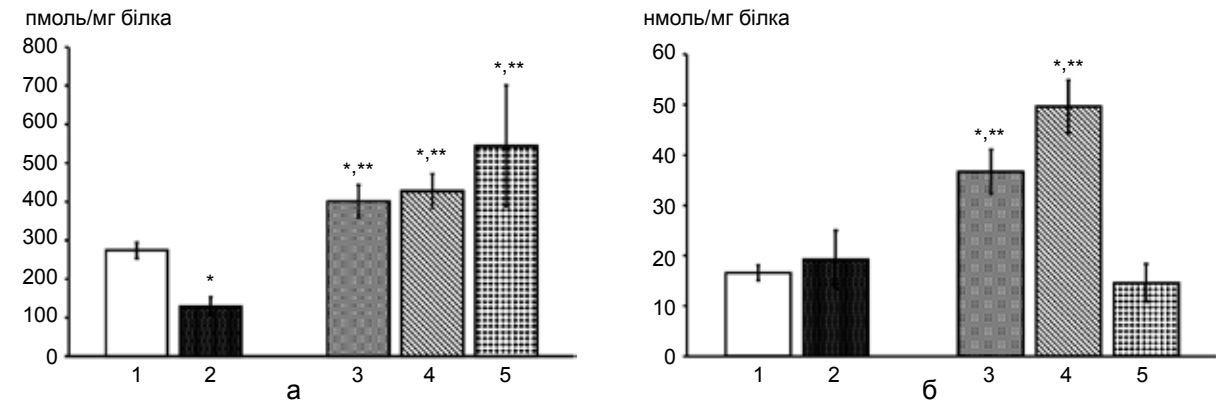


Рис. 3. Зміни вмісту NO₂⁻ (а) і NO₃⁻ (б) у плазмі щурів першої контрольної групи щурів (1), другої контрольної групи (2) та у основної групи при магнітолазерному впливі синім діапазоном спектра (тривалість 15 хв, інтенсивність 9, частота 10 Гц) впродовж: одного (3), п'яти (4) та десяти (5) сеансів. *P<0,05 – достовірно відносно першої контрольної групи щурів; **P<0,05 – достовірно відносно другої контрольної групи щурів

стимуляції ендogenous синтезу оксиду азоту в наших дослідах виявився МЛВ синім діапазоном спектра тривалістю 15 хв впродовж 10 сеансів. Саме після 10 сеансів і червоного, і синього МЛВ вміст NO_3^- суттєво знижувався. Це вказує на можливе зниження утворення пероксинітриту і/або на збільшення розпаду останнього за вільнорадикальним механізмом. Як відомо, пероксинітрит утворюється при надмірному синтезі NO і супероксид-аніона (*O_2^-), і розпадається з утворенням NO_3^- (нерадикальний механізм розпаду) і двох радикалів (*OH і *NO_2) за вільнорадикального механізму. Співвідношення інтенсивності цих альтернативних шляхів розпаду пероксинітриту сильно змінюється залежно від співвідношення швидкості генерації супероксиду і синтезу NO.

Проведені нами дослідження показали, що незважаючи на збільшення в плазмі вмісту NO_2^- як маркера біодоступності NO, при одноразовому червоному і синьому МЛВ, ендотеліязалежні АХ-індуковані реакції, які значно порушені у аорті ЩГДГ, не відновлювалися. При п'ятиразовому червоному і синьому МЛВ вміст стабільних метаболітів NO в плазмі щурів основної групи не тільки зростав у декілька разів, але й перевищував значення у плазмі щурів із нормальним тиском. Однак суттєвого поліпшення NO-

залежних АХ-індукованих реакцій ГМ не відбувалося, можливо, через підвищену інтенсивність утворення пероксинітриту і/або ферментативне окиснення NO оксигемоглобіном за можливого фотогомолізу еритроцитів. Обидва ці процеси супроводжуються значним підвищенням вмісту нітрат-аніона, що ми й спостерігали. Навіть при незмінних концентраціях останнього, відсутність стимуляції NO-залежної вазодилатації може спричинятися змінами у структурі розчинної гуанілатциклази, котра є рецептором NO і синтезує необхідний для реакції розслаблення цГМФ. Останній, в свою чергу, може розщеплюватися специфічними фосфодіестеразами, тим самим унеможливаючи реакцію розслаблення ГМ аорти ЩГДГ. Для встановлення точних причин відсутності NO-залежних реакцій в аорті щурів основної групи за умов МЛВ потрібні додаткові дослідження.

Ми з'ясували, що після десятиразового як червоного, так і синього МЛВ циркулюючий вміст NO_2^- у плазмі залишався значно вищим, ніж до освітлення, а NO_3^- суттєво знижувався. Адже відомо, що NO_2^- легко може бути відновлений до NO різними нітритредуктазами, так само як і нітрат відновлений до нітриту нітратредуктазами (наприклад, ксантиоксидазою, що має обидві редуктазні активності). Проте реакції ГМ аорти на АХ виявилися

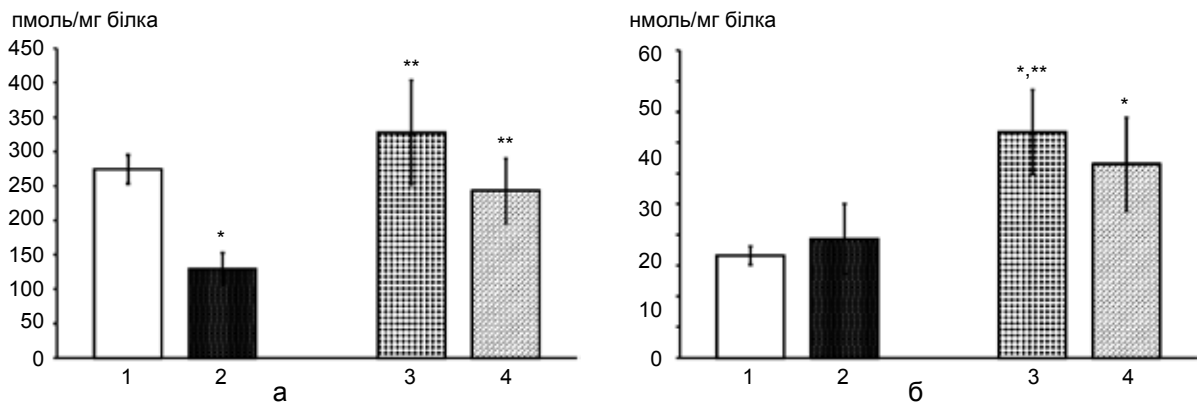


Рис. 4. Динаміка вмісту NO_2^- (а) і NO_3^- (б) у плазмі щурів першої контрольної групи (1), другої контрольної групи (2) та у основної групи при магнітолазерному впливі червоним (3) та синім (4) діапазонами спектра (тривалість 30 хв, інтенсивність 9, частота 10 Гц) впродовж 10 сеансів. * $P < 0,05$ – достовірно відносно першої контрольної групи щурів; ** $P < 0,05$ – достовірно відносно другої контрольної групи щурів

неоднозначними: при МЛВ синім діапазоном спектра частота розвитку ендотелійзалежних реакцій розслаблення ГМ на АХ була вищою, ніж при червоному діапазоні спектра; помітно підвищувалась і їх амплітуда.

Збільшення тривалості МЛВ обох діапазонів спектра до 30 хв також не відновлювало АХ-індуковані реакції ГМ аорти у щурів основної групи. Хоча вміст циркулюючих попередників NO при цьому значно збільшувався, актуалізуючи відсутність стимуляції синтезу цГМФ за такого режиму МЛВ.

Незалежна від ендотелію реакція ГМ грудної аорти ЩГДГ на нітропрурид натрію (екзогенний оксид азоту) при всіх нами досліджених параметрах МЛВ залишалася неушкодженою. Вона була дещо пригніченою або, навіть, суттєво стимульованою за певних режимів МЛВ. Це вказує на більшу ефективність використання МЛВ у комплексі з одночасним застосуванням донорів NO (наприклад, L-аргінін).

Отже, отримані нами результати засвідчили значну стимуляцію ендогенної продукції NO в організмі щурів основної групи після курсового (десятиразового) червоного і, особливо, синього МЛВ, незначну тенденцію до нормалізації ендотелійзалежних реакцій ГМ аорти на АХ і повну нормалізацію і, навіть, перевищення нормотензивного рівня, ендотелійнезалежного розслаблення ГМ аорти ЩГДГ. Гостро постає питання про можливе джерело ендогенної продукції NO в організмі щурів основної групи під МЛВ за умови відсутності стимуляції його *de novo* синтезу ферментом cNOS у плазмі і, навіть, за значного інгібування його синтезу ферментом iNOS (див. табл. 1). Найбільш вірогідною причиною, на нашу думку, може бути так звана декомпозиція або фотостимуляція гідролізу нітрозоглутатіону еритроцитів. Оксид азоту, який при цьому утворюється частково окисняється оксигемоглобіном еритроцитів до іонів NO_3^- , частково вступає в реакцію утворення пероксинітриду, який при розпаді також утворює NO_3^- . Залишається питання про шляхи утворення нітриду.

Дисфункція ендотелію, що деякою мірою зберігається після МЛВ, імовірно, є наслідком інтенсифікації утворення пероксинітриду, а, через це, суттєвого зниження біодоступності оксиду азоту за умов артеріальної гіпертензії. Про можливе зниження біодоступності NO у гладеньких м'язах судин вказують і дослідження Соловйова та співавт. [22]. Автори вважають, що однією із причин може бути значне підвищення процесу вільнорадикального окиснення в судинній стінці. Взаємодія NO із супероксид-аніоном призводить до його швидкої деактивації і перетворення в пероксинітрид. Останній є не тільки значно слабшим вазорелаксантом, ніж NO, але й має здатність активувати процеси перекисного окиснення ліпідів завдяки розпаду на два вільні радикали ($*\text{OH}$ і $*\text{NO}_2$). Друга можлива причина зниження біодоступності NO на їх думку полягає у тому, що при гіпертензії порушуються нормальні шляхи дифузії NO в судинній стінці. А саме, в нормі NO, який синтезується ендотеліоцитами дифундує до ГМ, де і реалізується його вазодилаторний ефект. За умов гіпертензії структурна цілісність ендотеліального шару може порушуватися, тому частина молекул NO попадає в кров'яне русло, де інактивується при взаємодії з оксигемоглобіном в результаті вільнорадикального окиснення.

Інші автори пригнічення NO-залежної функції ендотелію на тлі підсилення синтезу NO у ЩГДГ пояснюють зниженням експресії і активності ендотеліальної NOS (eNOS) і iNOS у ГМ судин і в макрофагах [24]. У нормі iNOS, як відомо, не синтезується, але під впливом супероксиду і цитокінів, що активують фактор транскрипції (NF- κ B), відбувається надекспресія iNOS і синтез NO в кількостях на декілька порядків вищих, ніж при роботі eNOS. Тому надлишковий рівень NO_2^- і NO_3^- свідчить про велику інтенсивність синтезу NO Ca^{2+} -незалежним ферментом iNOS. За таких умов, вважають ці автори, надлишок NO гальмує активність eNOS, пошкоджує ендотеліальні клітини,

пригнічуючи в них мітохондріальне дихання і синтез ДНК. В результаті Ca^{2+} -залежний синтез NO ферментом eNOS, а лише таким чином синтезований оксид азоту спричиняє активацію синтезу цГМФ, знижується, що посилює дисфункцію ендотелію. Вважають також, що дефіцит NO в судинах може бути зумовлений не лише зниженням активності фермента eNOS [24], але й руйнуванням або захопленням NO вільними радикалами [17, 26] або ослабленням дії NO на ГМ [31].

Раніше ми показали [18, 19], що за умов артеріальної гіпертензії змінюються пріоритети в метаболізмі субстрату оксиду азоту L-аргініну, а саме пригнічується його окиснення з утворенням NO і, відповідно, інтенсифікується неокисний (аргіназний шлях) і синтез карбаміду. Внаслідок цього порушується ендотеліальний компонент регуляції судинного тону. Це може стати причиною підвищення системного артеріального тиску, тоді як інгібування активності аргінази спричинило його зниження.

Магнітне поле, як і лазерне освітлення, впливає на ендотелій судин, підвищуючи активність NO-синтази і синтез оксиду азоту [28, 29].

На нашу думку, яка підтверджується даними інших авторів [21], магнітне поле підсилює дію лазерного впливу. При одночасному впливі НІЛО і МП крім простої сумачії енергій виникають і інші фізичні явища. Насамперед, ефект Кікоїна-Носкова: освітлення тканини в МП призводить до виникнення аномального ефекту Зеємана і електронного парамагнітного резонансу, відмічається вибіркоче поглинання світла [21].

Аналізуючи отримані результати можна передбачити, що використання антиоксидантів природного походження чи препаратів, які підвищують активність власної антиоксидантної системи організму, а також інгібіторів аргінази та донорів NO разом з МЛВ може виявитися ефективним способом корекції дисфункції ендотелію і системного артеріального тиску при гіпертензії.

ВИСНОВКИ

1. Результати нашого дослідження засвідчили значну стимуляцію ендогенної продукції NO в організмі щурів основної групи після курсового (десятиразового) червоного і, особливо, синього МЛВ, незначну тенденцію до нормалізації ендотеліозалежних реакцій ГМ аорти на АХ і повну нормалізацію і, навіть, перевищення нормотензивного рівня, ендотелінезалежного розслаблення ГМ аорти ЩГДГ.

2. Найбільш ефективним щодо стимуляції ендогенного синтезу оксиду азоту виявився МЛВ синім діапазоном спектра тривалістю 15 хв упродовж 10 сеансів.

3. Використання антиоксидантів природного походження чи препаратів, які підвищують активність власної антиоксидантної системи організму, а також інгібіторів аргінази та донорів NO разом з МЛВ може виявитися ефективним способом корекції дисфункції ендотелію і системного артеріального тиску при гіпертензії.

С.Н. Федоров, О.В.Базілюк, Ю.П. Коркач, В.Ф.Сагач

МАГНИТОЛАЗЕРНОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ НА СИСТЕМУ ОКСИДА АЗОТА И СОКРАТИТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ГЛАДКИХ МЫШЦ АОРТЫ ПРИ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ

Исследование проведено на трёх группах крыс: I группа – крысы линии Вистар с нормальным давлением (первая контрольная группа); II – крысы с генетически детерминированной гипертензией (вторая контрольная группа); III – крысы с генетически детерминированной гипертензией под магнитолазерным воздействием (основная группа). Для низкоинтенсивного магнитолазерного воздействия использовался аппарат МИТ-МТ (Украина), предназначенный для лечения низкочастотным магнитным полем с использованием оптического потока синего и красного диапазонов спектра. Продолжительность воздействия на животных: 15 мин для синего диапазона и 25 мин для красного диапазона. Биохимические исследования включали определение активности изоферментов NO-синтаз: конститутивную (cNOS) и индуцибельную (iNOS), содержание свободного гемоглобина, стабильных метаболитов NO, а именно нитрит (NO_2^-) и нитрат- (NO_3^-) анионов, устойчивость эритроцитов к кислотному гемолизу. Физиологическая методика заключалась в регистрирова-

нии сократительной активности гладких мышц аорты. Установлено, что магнитолазерное воздействие на крыс с генетически детерминированной гипертензией как при красном (длина волны 630 нм), так и при синем (длина волны 470 нм) оптическом диапазоне спектра даже при однократном использовании приводит к увеличению синтеза оксида азота в плазме крови. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что наиболее эффективным в интенсификации эндогенного синтеза оксида азота (повышение содержания NO_2^- и уменьшение NO_3^-), а также в эндотелийзависимой реакции расслабления гладких мышц аорты у крыс с генетически детерминированной гипертензией на ацетилхолин оказался десятисуточный курс проведения магнитолазерного воздействия в оптическом потоке синего диапазона спектра. Также после 10 сеансов магнитолазерного воздействия вышеупомянутым спектром происходит стабилизация мембран эритроцитов. Ключевые слова: магнитолазерное воздействие, оксид азота, гладкие мышцы аорты, стабилизация мембран эритроцитов, артериальная гипертензия.

S.M. Fedorov, O.V. Bazilyuk, Y.P. Korkach, V.F. Sagach

MAGNETIC-LASER INFLUENCE ON THE SYSTEM OF NITRIC OXIDE AND CONTRACTILE ACTIVITY OF SMOOTH MUSCLES OF RAT AORTA UNDER HYPERTENSION

The study was conducted on three groups of rats: Group I included Wistar rats with normal blood pressure (first control group); group II - rats with genetically determined hypertension (second control group); group III - rats with genetically determined hypertension under the influence of magnetic-laser power (study group). For the low-intensively magnetic-laser influence (MLI) we have used device MIT-MT, Ukraine, which was designed for the treatment of low-frequency magnetic field using optical flow blue and red ranges of spectrum. The MLI duration was 15 minutes for the blue range, and 25 minutes for the red one. Biochemical studies included the determination of the activity of isoenzymes of NO-synthase: constitutive (cNOS) and inducible (iNOS), the content of free hemoglobin, stable metabolites of NO, namely nitrite (NO_2^-) and nitrate (NO_3^-) anions, resistance to acid hemolysis of red blood cells. The contractile activity of smooth muscles of the aorta was measured. We found that magnetic-laser exposure of rats with genetically determined hypertension in the red (630 nm) and blue (470 nm wavelength) optical range even after a single session leads to an increased synthesis of nitric oxide in the blood plasma. Our data indicate that the most effective in the intensification of endogenous nitric oxide (increase of NO_2^- and reduction of NO_3^-) and endothelium-dependent responses of aorta in rats with genetically determined hypertension was a ten-day course of the magnetic-laser exposure in the optical flow of the blue spectral range. Also, after 10 sessions of magnetic-laser exposure in rats from the above specified spectrum a stabiliza-

tion of erythrocyte membranes was observed.

Key words: magnetic-laser influence, nitric oxide, smooth muscles, aorta, stabilization of erythrocyte membranes, hypertension.

P.L. Shupyk National Medical Academy of Postgraduate Education, Kyiv;

O.O. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Абрамович С.Г., Коровина Е.О., Бердникова И.А., Янчуковская Е.Н. Возможности физиотерапевтической коррекции вазомоторной функции эндотелия и микроциркуляции у больных артериальной гипертензией пожилого возраста // Физиотерапия, бальнеология и реабилитация. – 2009. – №4. – С.16–18.
2. Бобровницкий И.П., Князева Т.А., Кузнецова Л.Н., Отто М.П., Никифорова Т.И. Применение светодиодных аппаратов в серии «АПЭК» для лечения больных гипертонической болезнью // Пособие для врачей. – М., 2005. – 12 с.
3. Борисенко Г.Г., Постнов С.С., Владимиров Ю.А. Нитрозильные комплексы цитохромов митохондриальной цепи-первичные хромофоры в механизме фотоактивации дыхания // Биол. мембраны. – 2002. – 19, №5. – С.378–390.
4. Бувальцев В.И., Машина С.Ю., Покидышев Д.А., Смирин Б.В., Вайда Л.А., Малышев И.Ю., Манухина Е.Б. Роль коррекции метаболизма оксида азота в организме при профилактике гипертонического ремоделирования сердечно-сосудистой системы // Рос. кардиол. журн. – 2002. – 37, №5. – С.74–81.
5. Буйлин В.А., Ларюшин А.И., Никитина М.В. Светолазерная терапия // Руководство для врачей. – Тверь.: Триада, 2004. – 256 с.
6. Варакин Ю.А. Гиполипидемическая терапия в профилактике ишемического инсульта // Атмосфера. Нервные болезни. – 2006. – №3. – С.2–6.
7. Волошин П.В., Малахов В.А., Завгородняя А.Н. Эндотелиальная дисфункция при цереброваскулярной патологии. – Харьков, 2006. – 92 с.
8. Газданова А.А. Влияние лазерной терапии на функцию эндотелия, микроциркуляцию и некоторые показатели гемореологии у больных стабильной стенокардией: Автореф. дисс. ... к-та наук. – Владикавказ. – 2009. – 21 с.
9. Готто А.М. Развитие концепции дислипидемии, атеросклероза и сердечно-сосудистых заболеваний // Рус. мед. журн. – 2006. – 14, №17. – С.18–23.
10. Затеишикова А.А., Затеишиков Д.А. Эндотелиальная регуляция сосудистого тонуса: методы исследования и клиническое значение // Кардиология. – 1998. – №9. – С.68–81.
11. Зотова И.В., Затеишикова А.А., Сидоренко Б.А. Синтез оксида азота и развитие атеросклероза // Там же. – 2002. – №4. – С.58–67.
12. Карандашов В.И., Петухов Е.Б., Зродников В.С. Биологические и клинические эффекты фиолетового и

- синего света // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1997. – №4. – С. 452–454.
13. Коркушко О.В., Лишневецкая В.Ю. Эндотелиальная дисфункция. Клинические аспекты проблемы // Кровообіг та гемостаз. – 2003. – №2. – С.4–14.
 14. Лапшина Л.А., Молодан В.И., Шевченко О.С., Немцова В.Д. Эндотелиальная дисфункция при начальных стадиях артериальной гипертензии и способы ее немедикаментозной коррекции // Укр. терапев. журн. – 2001. – 3, №4. – С.39–42.
 15. Левадна А.В. Функціональний стан судинного ендотелію у хворих на дисциркуляторну енцефалопатію, що обумовлена стенозуючим ураженням внутрішньої сонної артерії // Укр. мед. альманах. – 2008. – 11, №4. – С.87–88.
 16. Марков Х.М. О биорегуляторной системе L-аргинин-окись азота // Патол. физиология и эксперим. терапия. – 1996. – №1. – С.34–39.
 17. Поливода С.Н., Черепок А.А. Роль оксидативного стресса и нарушения метаболизма оксида азота при гипертонической болезни // Серце і судини. – 2004. – 1, №5. – С.39–44.
 18. Сагач В.Ф., Базілюк О.В., Коцюруба А.В., Буханевич О.М. Порушення ендотеліязалежних судинних реакцій, аргіназного та NO-синтазного шляхів обміну L-аргініну при артеріальній гіпертензії // Фізіол. журн. – 2000. – 46, №3. – С.3–13.
 19. Сагач В.Ф., Коцюруба А.В., Базілюк О.В., Мегедь О.Ф., Степаненко Л.Г. Інгібітори аргіназного шляху метаболізму L-аргініну як новий шлях антигіпертензивних сполук: дія карбаміду на окисний і неокисний метаболізм L-аргініну і тонус судин при артеріальній гіпертензії // Там само. – 2004. – 50, №6. – С.9–18.
 20. Самосюк И.З., Лисенюк В.П., Лобода М.В. Лазеротерапия и лазеропунктура в клинической и курортной практике. – К.: Здоров'я, 1997. – 240 с.
 21. Самосюк И.З., Чухраев Н.В., Зубкова С.Т., Самосюк Н.И., Шишков Г.Е. Физические методы в лечении и медицинской реабилитации больных и инвалидов. – К.: Здоров'я, 2004. – 624 с.
 22. Соловьев А.И. Метаморфозы в «семействе» оксида азота. От зарождения жизни на земле до апоптоза и регуляции клеточных функций и коммуникаций // Лікування та діагностика. – 2003. – №3. – С.8–14.
 23. Терсков И.А., Гительзон И.И. Метод химических (кислотных) эритрограмм // Биофизика, 1957. – 2, № 2. – С.259–266.
 24. Gotto A.M. Evolving Concepts of Dyslipidemia, Atherosclerosis and Cardiovascular Disease // J. Amer. Coll. Cardiol. – 2005. – 46, №7. – P. 1219–1224.
 25. Chou T.C., Yen M.N., Li C.Y., Ding Y.A. Alterations of nitric oxide synthase expression with aging and hypertension in rats // Hypertension. – 1998. – 2, 31. – P.643–648.
 26. Grunfeld S., Hamilton C.A., Mesaros S., McClain S.W., Dominiczak A.F., Bohr D.F., Malinski T. Role of superoxide in the depressed nitric oxide production by the endothelium of genetically hypertensive rats // Ibid. – 1995. – 26, (6 Pt). – P.854–857.
 27. Millgard J., Hagg A., Sarabi M., Lind L. Endothelium-dependent vasodilation in normotensive subjects with a familial history of essential hypertension and in young subjects with borderline hypertension // J. Blood Press. – 2002. – 11, 5. – P.279–284.
 28. Okano H., Ohkubo C. Experimental to a moderate intensity static magnetic field enhances the hypotensive effect of a calcium channel blocker in spontaneously hypertensive rats // Bioelectromagnetics.-2005.-26.-P.611-623.
 29. Okano H., Onmori R., Tomita N., Ikada Y. Effects of moderate-intensity static magnetic field on VEGF-A stimulated endothelial capillary tube formation in vivo// Bioelectromagnetics.-2006.-27(8).-P.628-640.
 30. Soloviev A.I., Stefanov A.V., Bazilyuk O.V., Sagach V.F. Phospholipid vesicles (liposomes) restore endothelium-dependent cholinergic relaxation in thoracic aorta from spontaneously hypertensive rats // J. Hypertens. – 1993. – 11. – P.623–627.
 31. Soloviev A.I., Parshikov A.V., Stefanov A.V. Evidence for the involvement of protein Kinase C in depression of endothelium-dependent vascular responses in spontaneously hypertensive rats // J. Vasc. Rec. – 1998. – 35, №5. – P.325–331.

*Нац. мед. академія післядиплом. освіти ім. П.Л.Шупика, Київ;
 Ін-тут фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ
 E-mail: sergnsp@voliacable.com*

*Матеріал надійшов до
 редакції 21.06.2012*