

**ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова
Российской академии наук**

Лаборатория физиологии сердечно-сосудистой и лимфатической
систем

аспирант Унт Дарья Валерьевна

**«Сократительная функция лимфатических сосудов и узлов при
действии иммуномодуляторов»**

03.03.01 «Физиология»

Научный руководитель: д.м.н., профессор

Геннадий Иванович Лобов

2018 год

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Лимфатическая система представляет собой не только структурную основу иммунной системы, но и является важнейшим модулятором иммунного ответа. Модуляция осуществляется различными элементами лимфатической системы: 1) лимфатические капилляры регулируют скорость поступления антигена и дендритных клеток в лимфатические сосуды; 2) афферентные лимфатические сосуды способны замедлять или ускорять лимфоток, изменяя, таким образом, скорость доставки антигенов в лимфатические узлы; 3) эндотелиальные клетки лимфатических узлов осуществляют представление антигена лимфоцитам; 4) лимфатические узлы, изменяя силу и частоту сокращений, регулируют выход лимфоцитов из лимфатических узлов, 5) эфферентные лимфатические сосуды, изменяя тонус, частоту и амплитуду фазных сокращений, регулируют скорость доставки лимфоцитов в системный кровоток [Roosendaal R., 2009; Thomas S.N., 2012; Liao S. , 2015].

В регуляции транспортной функции лимфатических сосудов и лимфатических узлов принимают участие различные биологически активные вещества, как образующиеся в тканях в физиологических условиях, так и синтезируемые при воспалении и, в частности, цитокины и хемокины, продуцируемые макрофагами, лимфоцитами, антигенпрезентирующими и эндотелиальными клетками. Влияние этих биологически активных веществ на транспорт лимфы, без которого невозможна реализация иммунного ответа, не изучено. К цитокинам, продуцируемым при воспалении, относятся, в частности, интерфероны и интерлейкины, обладающие высокой биологической активностью. Интерфероны являются не только естественными модуляторами иммунного ответа, но и довольно широко применяются в клинической практике при лечении вирусных инфекций и некоторых злокачественных новообразований [Yeh M.L., 2015; Fabrizi F., 2015]. Поскольку гладкомышечные и эндотелиальные клетки имеют рецепторы к интерферонам I типа [Sano E., 2015], то, последние оказывают влияние на их функции. Помимо того, что интерфероны альфа-2b, бета-1a и гамма продуцируются в организме, часть из них являются официальными препаратами группы иммуномодуляторов. Несмотря на достаточно широкое клиническое использование, действие интерферонов на активную транспортную функцию лимфатических сосудов и лимфатических узлов до настоящего времени не изучено.

Вторая группа цитокинов, продуцируемых при воспалении – это интерлейкины. Интерлейкины оказывают плеiotропное влияние на различные клетки организма, в т.ч. и на клетки, принимающие участие в реализации иммунного ответа. Будучи высокомолекулярными соединениями, они транспортируются от места образования до системной циркуляции по

лимфатическим сосудам. Часть из них образуется непосредственно в лимфатических узлах. Некоторые интерлейкины, и, в частности, IL-1 β и IL-2, применяются в современной врачебной практике. Будучи белками, они применяются только парентерально, реабсорбируются из места инъекции исключительно в лимфатические капилляры и транспортируются по лимфатическим сосудам в лимфатические узлы, при этом оказывая влияние на эндотелиальные клетки и гладкомышечные клетки этих структур. Их действие на транспорт лимфы по лимфатическим сосудам и лимфатическим узлам также не изучалось.

Третья группа биологически активных веществ, играющих важную роль в регуляции воспалительных реакций и иммунного ответа – глюкокортикоиды. Глюкокортикоиды не относятся к иммуномодуляторам, тем не менее, играют важную роль в регуляции иммунного ответа. Они являются важнейшим элементом механизма отрицательной обратной связи в регуляции иммунитета и воспаления. Глюкокортикоиды используются в медицине при лечении различных заболеваний, в т.ч. и вызванных гиперактивными иммунными реакциями, таких как аллергия, астма, аутоиммунные заболевания и сепсис [Pujols L., 2002; Agnes E., 2011]. Глюкокортикоиды ингибируют развитие некоторых видов раковых клеток, поэтому используются в высоких дозах для лечения рака, лимфом и лейкозов [Miles A., 2015].

Таким образом, интерфероны, интерлейкины и глюкокортикоиды являются естественными модуляторами иммунных реакций и воспаления и, в то же время они широко применяются в клинической практике, в т.ч. и при тяжелых формах патологии. Все они осуществляют модуляцию иммунных реакций преимущественно в структурах лимфатической системы – лимфатических капиллярах, лимфатических сосудах и лимфатических узлах. И если их эффекты на иммунные реакции в значительной степени изучены [Ершов Ф.И., 1996; Feroon O. M., 1987; Симбирцев А. С., 2001; Dinarello C.A., 2011; Voumpas D.T., 1993; Baron S., 1992], то действие на транспортную функцию лимфатических сосудов и лимфатических узлов, без которой невозможна реализация иммунного ответа, не изучалось, что и послужило основанием для проведения данного исследования.

Цель исследования: Исследовать сократительную функцию лимфатических сосудов и лимфатических узлов при действии интерферонов, интерлейкинов и глюкокортикоидов и механизмы их действия на эндотелиальные и гладкомышечные клетки лимфатических сосудов и лимфатических узлов.

Задачи исследования:

1. Изучить изменения частоты и амплитуды фазных сокращений и тонического напряжения лимфатических сосудов и лимфатических узлов при действии интерферонов IFN- α -2b, IFN- β -1a и IFN- γ .
2. Исследовать механизмы прямого и эндотелий-опосредованного действия интерферонов IFN- α -2b, IFN- β -1a и IFN- γ на сократительную функцию лимфатических сосудов и лимфатических узлов.
3. Исследовать параметры сократительной активности лимфатических сосудов и лимфатических узлов при действии интерлейкинов IL-1 и IL-2.
4. Изучить механизмы действия интерлейкинов IL-1 и IL-2 на сократительную функцию гладкомышечных клеток лимфатических сосудов и лимфатических узлов.
5. Оценить кратковременные и долговременные эффекты глюкокортикоидов на фазную и тоническую сократительную активность лимфатических сосудов и лимфатических узлов.
6. Проанализировать негеномные и геномные эффекты глюкокортикоидов на сократительную функцию гладкомышечных клеток лимфатических сосудов и лимфатических узлов.

Научная новизна исследования

В работе впервые получены данные об ингибирующем влиянии интерферонов IFN- α -2b, IFN- β -1a и IFN- γ на тонус и фазную сократительную активность лимфатических сосудов и лимфатических узлов. Установлено, что эффекты интерферонов являются эндотелий-зависимыми и реализуются посредством стимуляции эндотелиальной синтазы NO и циклооксигеназы-1.

Получены новые данные, свидетельствующие о том, что IL-1 β и IL-2 тормозят сократительную функцию лимфатических сосудов и лимфатических узлов. Показано, что эффект IL-1 β является эндотелий-зависимым и осуществляется за счет усиления продукции эндотелиальными клетками NO. IL-2 ингибирует сократительную функцию лимфатических сосудов и лимфатических узлов как прямо, подавляя сократительную активность гладкомышечных клеток, так и опосредованно, повышая продукцию NO эндотелиоцитами.

Впервые установлено, что глюкокортикоиды оказывают стимулирующее влияние на транспортную функцию лимфатических сосудов и лимфатических узлов. В физиологических условиях их действие заключается в увеличении частоты и амплитуды фазных сокращений гладкомышечных клеток лимфатических сосудов и лимфатических узлов. Эффект является негеномным и реализуется посредством ингибирования эндотелиальной NO-синтазы и циклооксигеназы-1.

При воспалении глюкокортикоиды оказывают протективный эффект на транспортную функцию лимфатических сосудов и узлов. Протективный эффект является геномным и реализуется посредством ингибирования экспрессии индуцибельной NO-синтазы и циклооксигеназы-2.

Теоретическая и практическая значимость результатов исследования

- изучены эффекты интерферонов IFN- α -2b, IFN- β -1a и IFN- γ и интерлейкинов IL-1 β и IL-2 в разных концентрациях на сократительную функцию лимфатических сосудов и лимфатических узлов;

- установлены основные механизмы ингибирующего действия интерферонов и интерлейкинов на сократительную функцию лимфатических сосудов и лимфатических узлов;

- доказано, что ингибирующий эффект интерферонов и интерлейкинов на сократительную функцию лимфатических сосудов и лимфатических узлов является эндотелий-опосредованным;

- установлено, что в физиологических условиях глюкокортикоиды стимулируют сократительную функцию лимфатических сосудов и лимфатических узлов посредством торможения активности эндотелиальной NO-синтазы и циклооксигеназы;

- показано, что при воспалении глюкокортикоиды оказывают протективный эффект на лимфатические сосуды и лимфатические узлы посредством ингибирования индуцибельной NO-синтазы и циклооксигеназы-2.

Полученные данные, помимо теоретической значимости, могут иметь практическое применение при разработке комплекса лечебных мероприятий при тяжелых воспалительных процессах. Результаты исследования внедрены в курс лекций и практических занятий со студентами на кафедре нормальной физиологии Первого СПбГМУ им. академика И.П. Павлова Минздрава РФ, на кафедре патологической физиологии Первого СПбГМУ им. академика И.П. Павлова Минздрава РФ.

Основные положения исследования:

1. Интерфероны IFN- α -2b, IFN- β -1a и IFN- γ угнетают сократительную активность лимфатических сосудов и лимфатических узлов. Основным механизмом ингибиторного действия интерферонов в лимфатических сосудах заключается в активации эндотелиальной NO-синтазы. Вторым, менее значимым механизмом, является эндотелиальная гиперполяризация. В лимфатических узлах действие интерферонов реализуется за счет стимуляции эндотелиальной

NO-синтазы и циклооксигеназы. Образующиеся NO и PGI₂ тормозят сократительную функцию гладкомышечных клеток лимфатических узлов.

2. Интерлейкин-1 β ингибирует сократительную активность лимфатических сосудов и лимфатических узлов посредством связывания с мембранными рецепторами на эндотелиоцитах, что приводит к активации эндотелиальной NO-синтазы, увеличению продукции NO и расслаблению гладкомышечных клеток.

3. Механизм ингибирующего действия IL-2 на лимфатические узлы является более сложным и реализуется через взаимодействие с рецепторами на гладкомышечных клетках и эндотелиоцитах лимфатических узлов. В гладкомышечных клетках лимфатических узлов IL-2 стимулирует фосфоинозитидный механизм активации сократительного аппарата, что приводит к повышению тонуса лимфатических узлов. Параллельно с этим IL-2 активирует эндотелиальную NO-синтазу, что приводит к увеличению концентрации NO и уменьшению параметров фазных сокращений.

4. Глюкокортикоиды в физиологических условиях стимулируют сократительную активность лимфатических сосудов и лимфатических узлов, что проявляется в повышении тонуса и увеличении частоты и амплитуды фазных сокращений. Механизм действия глюкокортикоидов является негеномным, эндотелий-опосредованным и реализуется за счет ингибирования эндотелиальной NO-синтазы и циклооксигеназы -1.

5. При воспалении, и в частности, при сепсисе, глюкокортикоиды оказывают выраженный протективный эффект на лимфатические сосуды и лимфатические узлы. Цитокины, образующиеся при воспалении, ингибируют сократительную активность лимфатических сосудов и лимфатических узлов. Введение на фоне воспаления глюкокортикоидов значительно снижает тормозный эффект цитокинов на лимфатические сосуды и лимфатические узлы. В этом случае эффект глюкокортикоидов реализуется геномным механизмом посредством ингибирования экспрессии индуцибельной NO-синтазы и циклооксигеназы -2.

Степень достоверности. Достоверность научных положений и выводов в исследовании обеспечена применением современной методики регистрации фазной активности, использованием достаточного объема фактического материала (брыжеечные лимфатические сосуды и узлы быка (93 и 98 штук, соответственно от 32 животных) и крысы линии Sprague Dawley (36 лимфатических сосудов и 42 лимфатических узла от 36 крыс), его анализом, корректной статистической обработкой данных. Статистически обработано 3868 измерений параметров сократительной активности лимфатических сосудов и лимфатических узлов с использованием «StatSoft STATISTICA 6.1.478». За критический уровень значимости

принимали $p=0,05$. Полученные данные имели нормальное распределение, они представлены в виде средних значений с их стандартным отклонением ($M \pm SE$). Для установления достоверности различий использовали t-критерий Стьюдента.

Апробация результатов диссертации. Результаты проведенных исследований представлены в виде докладов и обсуждены на: 1. X Международной конференции «Микроциркуляция и гемореология», 5-8 июля 2015 г., г. Ярославль, Россия. 2. XV Всероссийском совещании с международным участием по эволюционной физиологии посвященным памяти академика Л. А. Орбели и 60-летию Института эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова, 17-22 октября 2016 г., г. Санкт-Петербург, Россия. 3. Второй международной научно-практической конференции «Экспериментальные и клинические аспекты микроциркуляции и функции эндотелия», 16-17 ноября 2016 г., г. Смоленск, Россия. 4. Санкт-Петербургском научном форуме 100-летия Физиологического общества им. И.П. Павлова, 17-19 апреля 2017г., г. Санкт-Петербург, Россия. 5. Конференции «Нейрогуморальные механизмы регуляции висцеральных функций в норме и при патологии» 23 мая 2017 г., г. Томск, Россия. 6. XII Международном симпозиуме по фундаментальным и прикладным проблемам науки, 12-14 сентября 2017 г., г. Миасс, Россия. 7. XXIII съезде физиологического общества им. И.П. Павлова, 18-22 сентября 2017 г., г. Воронеж, Россия. 8. Международном молодежном научном форуме «Ломоносов» МГУ им. М.В. Ломоносова, 9-13 апреля 2018 г., г. Москва, Россия.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 13 печатных работ: 4 статьи – в научных рецензируемых журналах, входящих в список ВАК, 1 статья – в научном рецензируемом журнале, 2 статьи – в материалах международных научных конференций и 6 тезисов докладов на научных конференциях.

Личный вклад соискателя. Личное участие автора осуществлялось на всех этапах выполнения работы и включало планирование и проведение исследований по всем разделам диссертации, формулирование целей и задач, определение объема и методов исследования, подбор, перевод и анализ литературы по теме диссертационной работы, статистическую обработку результатов, анализ и обобщение полученных данных. Лично автором проводилось приготовление препаратов в требуемых концентрациях, эксперименты, операции на животных. В публикациях, подготовленных в соавторстве, личный вклад соискателя составляет 75 %.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 185 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, результатов исследования, обсуждения результатов, заключения, выводов и списка литературы, включающего 77 источников на русском и 210 на иностранных языках. Диссертация иллюстрирована 8 таблицами и 48 рисунками.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования служили брыжеечные лимфатические сосуды (ЛС) и лимфатические узлы (ЛУ) быка (93 и 98 штук, соответственно от 32 животных) и крысы линии Sprague Dawley (36 ЛС и 42 ЛУ от 36 крыс). Препараты размещали в вертикальной проточной термостатируемой камере объемом 1,25 мл. Нижний конец препарата фиксировали к манипулятору с микрометром, а верхний - присоединяли к изометрическому датчику силы FORT-10 (WPI, США). Сигнал от датчика силы поступал в блок Labmaster (усилитель + АЦП) (Pavlov Institute of Physiology RAS), далее – в компьютер, данные обрабатывались программой Labmaster с использованием пакета прикладных программ MATLAB. Эксперименты проводили при непрерывном протоке физиологического солевого раствора следующего состава (в мМ/л): NaCl - 120,4; KCl - 5,9; CaCl₂ - 2,5; MgCl₂ - 1,2; NaH₂PO₄ - 1,2; NaHCO₃ - 15,5; глюкоза - 11,5. Скорость протока раствора составляла 2,5 мл/мин. Физиологический раствор непрерывно сатураировали газовой смесью, состоящей из 95% O₂ и 5% CO₂. Температуру раствора в камере поддерживали на уровне 37,0±0,1°C с помощью непрерывной циркуляции воды из внешнего контура термостата LOIP LT-105a. Исследуемые препараты подвергали натяжению исходя из величины трансмурального давления 3 см водного столба (в соответствии с законом Лапласа).

Предметами исследования в нашей работе были: 1) тонус ЛС и ЛУ при применении интерферонов, интерлейкинов и глюкокортикоидов (ГК) 2) амплитуда и частота фазных сокращений ЛС и ЛУ при действии интерферонов, интерлейкинов и ГК и 2) механизмы действия интерферонов, интерлейкинов и глюкокортикоидов на эндотелиальные и гладкомышечные клетки ЛС и ЛУ.

ЭФФЕКТЫ И МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ ИНТЕРФЕРОНОВ НА СОКРАТИТЕЛЬНУЮ ФУНКЦИЮ ЛИМФАТИЧЕСКИХ СОСУДОВ И УЗЛОВ

Изучены параметры сократительной активности ЛС и ЛУ при действии трех видов **интерферонов**: IFN-α-2b, IFN-β-1a и IFN-γ.

В процессе исследования установлено, что IFN- α -2b в концентрации 250-500 МЕ/мл оказывал ингибиторное действие на сократительную функцию ЛС, приводя к снижению тонуса препаратов и уменьшению частоты и амплитуды фазных сокращений. Повышение концентрации IFN- α -2b до 1000 МЕ/мл на протяжении 2-3 минут приводило к полному подавлению фазной сократительной активности ЛС (Рис. 1).

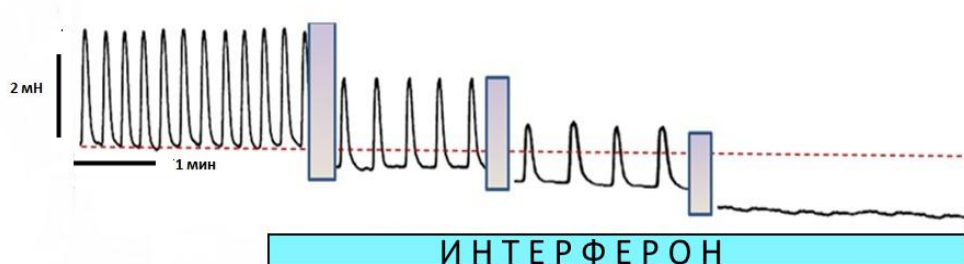


Рис.1. Действие IFN- α -2b в концентрации 250 МЕ/мл на сократительную активность лимфатического сосуда. Разрывы кривой соответствуют 3-минутной остановке записи. Пунктирной линией обозначен исходный тонус препарата.

На деэндотелизированные препараты IFN- α -2b оказывал слабый ингибирующий эффект, в половине случаев изменения параметров сократительной активности ЛС были недостоверными. Результаты этой серии экспериментов дали основание предположить, что ингибиторный эффект IFN- α -2b на ЛС является преимущественно эндотелий-опосредованным.

Учитывая, что эндотелий ЛС в физиологических условиях, а также при действии ряда фармакологических агентов продуцирует NO и простаглицлин (PGI₂), были проведены исследование возможного участия NO и простаглицлина в реализации ингибиторного эффекта IFN- α -2b на ЛС. С этой целью на фоне действия IFN- α -2b (1000 МЕ/мл) в физиологический раствор добавляли L-NAME (ингибитор синтазы NO). Действие L-NAME на интактные ЛС на протяжении 15 минут приводило к повышению тонуса ЛС и появлению редких фазных сокращений. Эти данные подтверждают участие эндотелиального NO в реализации ингибиторного эффекта IFN- α -2b на ЛС. По такой же схеме было проведено исследование возможного участия простаглицлина в реализации тормозного эффекта IFN- α -2b на ЛС. На фоне действия IFN- α -2b в раствор вводили индометацин (ингибитор циклооксигеназы). Эффект индометацина проявлялся медленнее по сравнению с эффектом L-NAME, но также приводил к повышению тонического напряжения ЛС и появлению редких фазных сокращений. Эти данные свидетельствуют о том, что простаглицлин также вовлекается в реализацию ингибирующего эффекта IFN- α -2b на ЛС.

Совместное применение двух ингибиторов (L-NAME и индометацина) приводило к большему повышению тонуса ЛС, сниженного под воздействием IFN- α -2b. При этом восстанавливались фазные сокращения с частотой, значительно большей по сравнению с эффектом одного из ингибиторов. Однако в этих экспериментах тонус ЛС не восстанавливался до исходного, амплитуда и частота фазных сокращений также были ниже исходных. Эти данные дали основание предположить, что помимо NO и простаглицлина в реализации ингибиторного эффекта IFN- α -2b на ЛС принимают участие какие-то другие эндотелий-опосредованные механизмы. Известно, что в артериях эндотелий-опосредованную вазодилатацию обеспечивают не только NO и простаглицлин, но и эндотелиальная гиперполяризация. Гиперполяризующий фактор активирует Ca²⁺-чувствительные K⁺-каналы малой, промежуточной или большой проводимости, приводя в итоге к гиперполяризации мембраны ГМК, их расслаблению и вазодилатации.

При исследовании участия эндотелиальной гиперполяризации в дилатации ЛС, вызванной IFN- α -2b, продукцию NO и простаглицлина, блокировали L-NAME и индометацином. После частичного восстановления тонуса ЛС в раствор поочередно вводили тетраэтиламмония хлорид (ТЭА) - блокатор Ca²⁺-чувствительных K⁺-каналов большой проводимости, харибдотоксин, являющийся блокатором Ca²⁺-чувствительных K⁺-каналов промежуточной и большой проводимости, и апамин – блокатор Ca²⁺-чувствительных K⁺-каналов малой проводимости. Введение ТЭА не приводило к значимым изменениям тонуса ЛС, а применение харибдотоксина и апамина сопровождалось достоверным возрастанием тонуса и повышением частоты фазных сокращений ЛС. Полученные данные свидетельствуют о том, что IFN- α -2b активирует в ЛС Ca²⁺-чувствительные K⁺-каналы малой и промежуточной проводимости и тем самым приводит к эндотелиальной гиперполяризации и расслаблению ГМК (Рис.2).

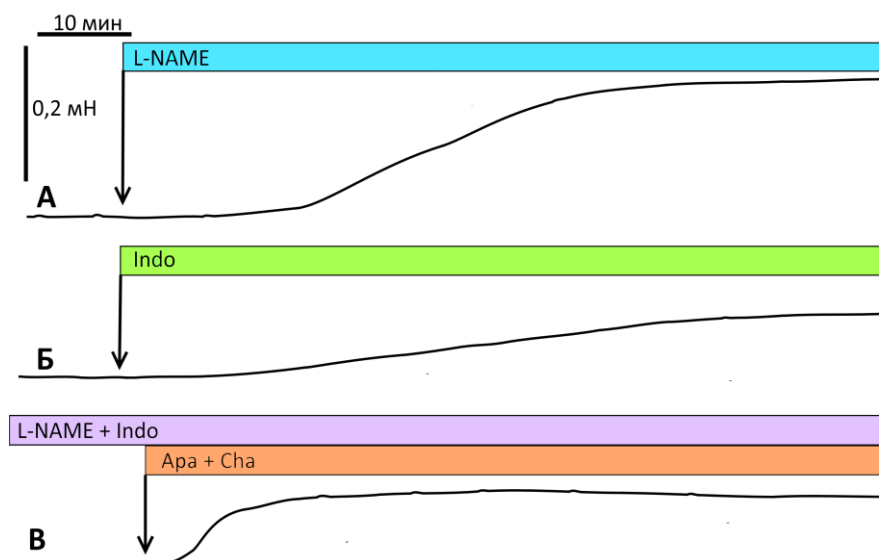


Рис. 2. Изменения тонуса брыжеечного лимфатического сосуда быка при применении различных ингибиторов синтеза вазодилататоров на фоне действия интерферона IFN- α -2b (500 МЕ/мл): А – реакция на ингибитор синтазы NO – L-NAME; Б - реакция на индометацин; В - реакция на введение в раствор aramin + charybdotoxin на фоне L-NAME и индометацина.

Влияние **IFN- β -1a** на сократительную функцию ЛС было изучено нами по схеме, аналогичной исследованию эффектов IFN- α -2b. Действие IFN- β -1a заключалось в снижении тонуса ЛС и уменьшении амплитуды и частоты их фазных сокращений, а в высоких концентрациях – в прекращении фазных сокращений ЛС на фоне выраженной дилатации. В экспериментах с деэндотелизированными сегментами ЛС было установлено, что эффект IFN- β -1a является эндотелийзависимым.

Посредством применения ингибиторов NO-синтазы, циклооксигеназы и блокаторов Ca^{2+} -чувствительных K^+ -каналов – ТЭА, апамина и харибдотоксина было выявлено, что основным механизмом ингибирования IFN- β -1a сократительной функции ЛС является NO-опосредованный путь сигнализации. Установлено, что простаглицлин также принимает участие в дилатации ЛС, вызванной IFN- β -1a, но значение этого механизма выражено слабее по сравнению с ролью NO. Влияние IFN- β -1a на эндотелиальную гиперполяризацию ЛС слабо выражено, однако, отмечена значимая роль Ca^{2+} -чувствительных K^+ -каналов промежуточной проводимости в ингибировании сократительной функции ЛС. Другие типы Ca^{2+} -чувствительных K^+ -каналов не были задействованы в дилатации ЛС, вызванной IFN- β -1a.

Схема исследования эффектов и механизмов действия IFN- γ на сократительную функцию брыжеечных ЛС быка была аналогичной исследованию эффектов IFN- α -2b и IFN- β -1a. IFN- γ оказывал на интактные ЛС ингибирующий эффект, первоначально приводя к

уменьшению частоты и амплитуды их фазных сокращений, а при длительном действии – к прекращению фазных сокращений и снижению тонуса. Эффект был обратимым, удаление IFN- γ из раствора сопровождалось медленным повышением тонуса и восстановлением фазной ритмической активности.

Дилататорный эффект IFN- γ на деэндотелизированные ЛС был значительно слабее по сравнению с интактными, что позволило предположить преимущественно эндотелийзависимый механизм ингибирующего действия IFN- γ . Исследования роли NO и индометацина в дилатационном эффекте IFN- γ на ЛС показало, что преобладающим механизмом дилатации является простаглицлин-опосредованный механизм. NO также принимал участие в дилатации ЛС при действии IFN- γ , но его роль была менее значимой.

Исследование роли эндотелийзависимой гиперполяризации в ингибирующем эффекте IFN- γ на ЛС показало участие этого механизма в дилатации ЛС. Апамин и харибдотоксин на фоне ингибирования NO-синтазы и циклооксигеназы не оказывали статистически значимого влияния на параметры сократительной активности ЛС при действии IFN- γ . В то же время применение ТЭА приводило к повышению тонуса как интактных, так и деэндотелизированных ЛС на фоне действия IFN- γ , что дало основание заключить об активации интерфероном- γ Ca^{2+} -чувствительных K^+ -каналов большой проводимости на эндотелиоцитах и ГМК ЛС.

При исследовании эффектов интерферонов на **лимфатические узлы** эксперименты проводили по аналогичной схеме. Интерфероны (IFN- α -2b, IFN- β -1a, IFN- γ) при действии на интактные полоски капсулы ЛУ (с сохраненным субкапсулярным синусом) оказывали ингибиторный эффект на сократительную функцию ЛУ, а в концентрации выше 1000 МЕ/мл полностью подавляли фазную сократительную активность. На деэндотелизированные полоски капсулы интерфероны оказывали слабый тормозный эффект, снижение тонуса было значительно меньшим по сравнению с интактными препаратами, спонтанная фазная активность не прекращалась, хотя и наблюдалось урежение ритма и снижение амплитуды фазных сокращений. Эти данные дали основание предположить, что ингибиторный эффект всех трех интерферонов на сократительную активность ГМК ЛУ является преимущественно эндотелийзависимым.

Применение ингибитора NO-синтазы L-NAME при исследовании интактных полосок капсулы ЛУ приводило к уменьшению ингибиторного эффекта интерферонов. В этих экспериментах в наибольшей степени нивелировался тормозный эффект IFN- γ , что дало нам основание заключить, что в ЛУ этот интерферон активирует преимущественно NO-опосредованный механизм релаксации. Действие L-NAME в опытах с применением IFN- α -2b и

IFN- β -1a также уменьшало релаксационный эффект на ЛУ, но степень уменьшения была менее выраженной.

Применение индометацина (ингибитор циклооксигеназы) в опытах с интактными полосками капсулы ЛУ, снижало релаксационный эффект всех трех интерферонов, что дало основание заключить об участии простаглицина в этом процессе. Максимальное снижение релаксационного эффекта наблюдалось при действии индометацина на фоне IFN- β -1a, минимальное – на фоне IFN- γ . Блокаторы Ca²⁺-чувствительных K⁺-каналов не приводили к статистически значимым изменениям реакций ЛУ на интерфероны.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что релаксационный эффект интерферонов на ЛУ реализуется посредством активации эндотелиальной NO-синтазы и циклооксигеназы. IFN- β -1a приводит к релаксации полосок капсулы ЛУ преимущественно за счет стимуляции продукции простаглицина, роль NO менее значима. Релаксационный эффект IFN- γ на ЛУ является преимущественно NO-опосредованным. IFN- α -2b приводит к расслаблению ЛУ посредством стимуляции NO-синтазы и циклооксигеназы примерно в одинаковой степени. На ГМК капсулы ЛУ интерфероны не оказывают значимых влияний.

ЭФФЕКТЫ И МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ ИНТЕРЛЕЙКИНОВ НА СОКРАТИТЕЛЬНУЮ ФУНКЦИЮ ЛИМФАТИЧЕСКИХ СОСУДОВ И УЗЛОВ

При добавлении IL-1 β в физиологический раствор, омывающий ЛС, в концентрации 10⁻¹¹ М наблюдался выраженный ингибиторный эффект на тонус, амплитуду и частоту фазных сокращений ЛС (Рис.3). Достаточно быстрое развитие ингибиторного эффекта позволило предположить, что IL-1 β оказывает действие на ЛС посредством связывания с мембранными рецепторами гладкомышечных и (или) эндотелиальных клеток. Ранее при исследовании кровеносных сосудов было показано, что рецепторы IL-1 располагаются на мембране различных клеток, в т.ч. эндотелиальных и гладкомышечных. С целью подтверждения гипотезы о рецептор-опосредованном механизме действия IL-1 β на ЛС за 10 минут до введения IL-1 β в физиологический раствор добавляли антагонист рецепторов интерлейкина-1 – анакинру. В этом случае ингибиторный эффект IL-1 β на интактные ЛС не проявлялся, таким образом, предположение о рецептор-опосредованном механизме действия IL-1 β на ЛС подтвердилось.

Поскольку реакции деэндотелизированных сегментов ЛС на IL-1 β сильно отличались от реакций интактных препаратов, было сделано предположение об эндотелийзависимом механизме действия IL-1 β на ЛС. Дальнейшие исследования были проведены на препаратах, предварительно сокращенных норадреналином. Норадреналин значительно повышал тонус ЛС и ЛУ, при этом фазные сокращения прекращались. Соответственно, анализировался только

один параметр – величина тонического напряжения препаратов. В этой серии экспериментов за 15 минут до добавления в физиологический раствор IL-1 β вводили L-NAME. Ингибирование NO-синтазы приводил к существенному снижению ингибиторного эффекта IL-1 β , что дало нам основание заключить, что действие IL-1 β на ЛС является NO-опосредованным.

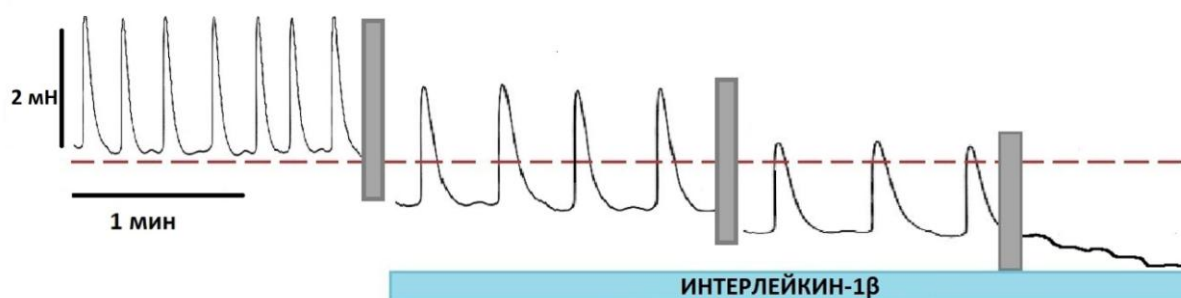


Рис. 3. Действие интерлейкина-1 β в концентрации 10^{-11} М на сократительную активность лимфатического сосуда. Разрывы кривой соответствуют 3-минутной остановке записи. Пунктирной линией обозначен исходный тонус препарата.

В другой серии опытов перед применением IL-1 β в раствор вводили ингибитор циклооксигеназы – индометацин. Последующее добавление в раствор IL-1 β сопровождалась незначительным снижением тонуса ЛС. Предварительное введение в раствор апамина и харибдотоксина значительно снижало ингибирующий эффект IL-1 β в ЛС. ТЭА не оказывал значимого влияния на величину ингибирующего эффекта IL-1 β .

Полученные данные дали основание сделать выводы о механизмах ингибиторного эффекта IL-1 β на сократительную активность ЛС. Поскольку анакинра - антагонист рецепторов интерлейкина-1 I типа, практически полностью предотвращал ингибиторный эффект IL-1 β в интактных препаратах, есть основание полагать, что действие IL-1 β реализуется посредством связывания с мембранными рецепторами IL-1 I типа. Деэндотелизированные препараты ЛС слабо реагировали на IL-1 β и, учитывая, что на мембране эндотелиальных клеток располагается значительное количество рецепторов IL-1 I типа, можно полагать, что IL-1 β взаимодействует преимущественно с рецепторами на мембране эндотелиальных клеток ЛС. Есть основания полагать, что на мембране ГМК ЛС и ЛУ нет (или мало) рецепторов к IL-1 β и они не играют значимой роли в реакции ЛС на IL-1 β .

Результаты применения ингибиторов нескольких сигнальных путей позволяют сделать заключение о том, что комплекс IL-1 β -рецептор активирует в эндотелиоцитах ЛС несколько сигнальных механизмов. Первый из них – активация конститутивной синтазы NO. Увеличение

продукции эндотелиоцитами NO сопровождается снижением всех параметров сократительной активности ГМК ЛС. Эта часть ингибирующего эффекта IL-1 β предотвращалась добавлением в раствор ингибитора синтазы NO – L-NAME. Второй механизм дилатации ЛС при действии IL-1 β – это активация эндотелийзависимой гиперполяризации, приводящей к расслаблению ГМК ЛС. Эта часть ингибирующего эффекта IL-1 β предотвращалась как при предварительном введении в физиологический раствор ингибиторов Ca²⁺-зависимых K⁺-каналов малой и промежуточной проводимости – апамина и харибдотоксина, так и при добавлении этих ингибиторов на фоне действия IL-1 β . Роль простаглицина в развитии ингибиторного эффекта IL-1 β значительно в ЛС была незначительной (Рис.4).

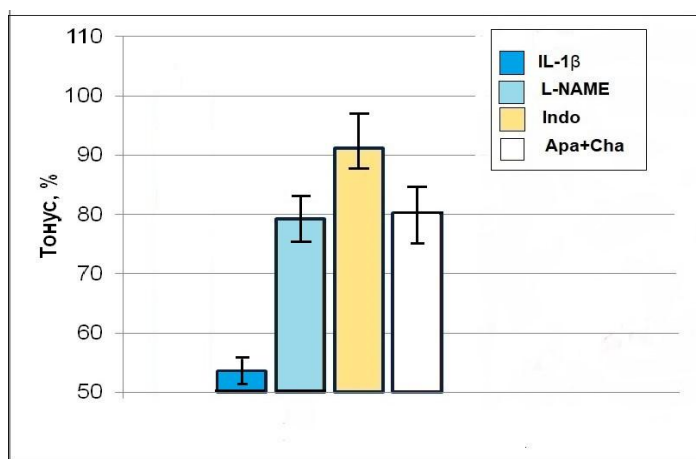


Рис. 4. Тонус лимфатических сосудов при действии интерлейкина-1 β (10^{-11} М) на фоне применения ингибиторов синтеза эндотелиальных вазодилататоров. IL-1 β (10^{-11} М) - тонус при действии IL-1 β , L-NAME – тонус при действии IL-1 β на фоне ингибитора синтазы NO; Indo – тонус при действии IL-1 β на фоне индометацина, Apa+ Cha - тонус при действии IL-1 β на фоне апамина и харибдотоксина (данные представлены в % от величины тонуса в растворе с нордреналином).

IL-2 приводил к медленному повышению тонуса ЛС, который оставался повышенным в течение всего времени действия IL-2. Параметры фазных сокращений ЛС при этом изменялись незначительно. Удаление IL-2 из раствора приводило к медленному восстановлению тонуса ЛС. Повышение концентрации IL-2 приводило к еще большему повышению тонуса ЛС. Достоверных отличий между реакциями на IL-2 интактных и деэндотелизированных ЛС не было выявлено.

Учитывая данные о том, что IL-2 стимулирует в ГМК фосфоинозитидный механизм, были проведены опыты с применением LY-294002, являющегося ингибитором фосфоинозитид-3-киназы. На фоне блокады фосфоинозитид-3-киназы IL-2 не приводил к достоверным изменениям параметров сократительной деятельности ГМК ЛС. Можно полагать, что ГМК ЛС,

так же, как и в кровеносные сосуды, имеют мембранные IL-2R. Действие IL-2 на IL-2R ГМК ЛС, по-видимому, так же, как и в артериях, стимулирует фосфоинозитидный механизм активации сократительного аппарата ГМК, что приводит к повышению тонуса ЛС.

На ЛУ IL-2 оказывал ингибиторный эффект, действие IL-2 приводило к уменьшению параметров фазных сокращений (снижению частоты и амплитуды) и небольшому снижению тонуса интактных капсул ЛУ. В то же время при действии на деэндотелизированные капсулы ЛУ тонус препаратов возрастал, а частота и амплитуда фазных сокращений практически не изменялась. Ориентируясь на данные о том, что IL-2 активирует в клетках несколько сигнальных путей, в т.ч. и фосфоинозитидный механизм, мы протестировали влияние IL-2 на деэндотелизированные капсулы ЛУ на фоне LY-294002, являющегося ингибитором фосфоинозитид-3-киназы. На фоне этого ингибитора не было зарегистрировано достоверных изменений тонуса и параметров фазных сокращений. Эти данные дали нам основание заключить, что IL-2 стимулирует в ГМК капсулы ЛУ фосфоинозитидный механизм активации сократительного аппарата.

Поскольку были обнаружены достоверные различия в реакциях интактных и деэндотелизированных полосок капсулы ЛУ на IL-2, были основания предположить, что IL-2 действует на эндотелиальные клетки субкапсулярного синуса ЛУ. С целью исследования возможных механизмов влияния IL-2 на эндотелиоциты субкапсулярного синуса, проведены эксперименты с применением ингибиторов NO-синтазы и циклооксигеназы (L-NAME и индометацина) и также блокаторов Ca^{2+} -активируемых K^{+} -каналов большой, промежуточной и малой проводимости. Различия в реакциях были обнаружены только при применении индометацина. Присутствие в растворе индометацина нивелировало ингибиторный эффект IL-2 на фазную сократительную активность интактных полосок капсулы ЛУ. Другие ингибиторы не оказывали значимого влияния на реакции ЛУ на IL-2.

Таким образом, полученные экспериментальные данные позволяют сделать следующее заключение о механизмах действия IL-2 на сократительную функцию ЛУ. С одной стороны, IL-2, по-видимому, через IL-2R стимулирует в ГМК капсулы ЛУ фосфоинозитидный механизм, приводящий к активации сократительных белков и повышению тонуса ЛУ. С другой, в отличие от ЛС, IL-2R прямо или опосредованно стимулирует продукцию простаглицлина эндотелиальными клетками. Наши данные не позволяют сделать заключение о непосредственном влиянии IL-2R на эндотелиальные клетки.

ЭФФЕКТЫ И МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ ГЛЮКОКОРТИКОИДОВ НА СОКРАТИТЕЛЬНУЮ ФУНКЦИЮ ЛИМФАТИЧЕСКИХ СОСУДОВ И УЗЛОВ

При изучении **негеномных эффектов ГК на ЛС** было установлено, что гидрокортизон и дексаметазон стимулируют сократительную активность ЛС. При их действии тонус ЛС повышался, возрастала частота их фазных сокращений. При этом часто наблюдалось снижение их амплитуды, что, по нашему мнению, связано со сложной хроно-инотропной зависимостью в ЛС. Стимулирующий эффект ГК начинал проявляться на 4-5 минутах воздействия и достигал максимума к 7-10 минутам. Быстрое развитие эффекта дексаметазона на сократительную функцию ЛС (в течение нескольких минут) дало основание заключить, что он реализуется посредством негеномного механизма (Рис.5).

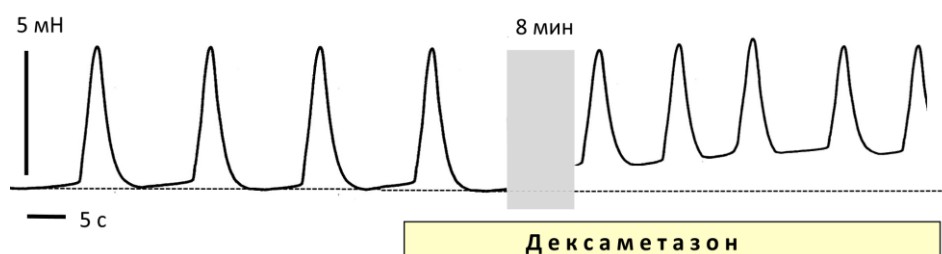


Рис. 5. Сократительная активность ЛС при действии дексаметазона (0,4 мг/л). Пунктирная линия показывает исходный уровень тонуса препарата. Разрыв на кривой соответствует интервалу времени 8 мин.

Меньшие реакции деэндотелизированных ЛС на ГК по сравнению с аналогичными реакциями интактных ЛС дали основание предположить, что реакции ЛС на ГК являются преимущественно эндотелий-зависимыми. С целью исследования механизмов стимулирующего эффекта ГК нами были проведены эксперименты с ингибированием эндотелиальной синтазы NO и циклооксигеназы и блокадой Ca^{2+} -чувствительных K^+ -каналов большой, промежуточной и малой проводимости.

Поскольку на фоне действия L-NAME дексаметазон оказывал меньший стимулирующий эффект на ЛС по сравнению с его эффектом в физиологическом растворе, можно прийти к заключению, что часть стимулирующего эффекта ГК на ЛС реализуется за счет ингибирования ими эндотелиальной NO-синтазы. При ингибировании циклооксигеназы стимулирующий эффект ГК на ЛС был слабо выраженным (Рис.6). Применение ГК на фоне блокаторов Ca^{2+} -

чувствительных K^+ -каналов большой и промежуточной проводимости (тетраэтиламмония и харибдотоксина) не привело к изменению параметров сократительной активности ЛС.

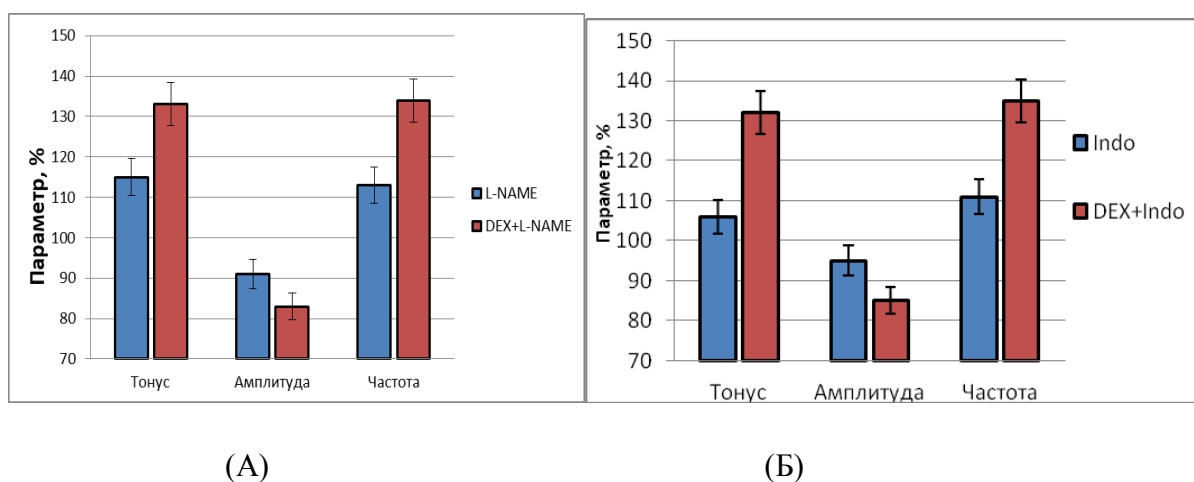


Рис.6. Действие дексаметазона (DEX) на сократительную активность лимфатических сосудов на фоне ингибитора синтазы NO (L-MAME) (А) и на фоне ингибитора циклооксигеназы – индометацина (Indo) (Б). Тонус, амплитуда и частота фазных сокращений представлены в % по отношению к их величинам, зарегистрированным на интактных препаратах в физиологическом растворе. Все изменения параметров сократительной активности ЛС при действии дексаметазона на фоне L-MAME и индометацина достоверны, $p \leq 0,05$.

Таким образом, можно заключить, что часть стимулирующего эффекта ГК на ЛС реализуется посредством ингибирования эндотелиальной NO-синтазы. Ранее было показано, что в физиологических условиях эндотелиоциты ЛС продуцируют некоторое базальное количество NO, несколько снижающее тонус, амплитуду и частоту их фазных сокращений. Ингибирование ГК эндотелиальной NO-синтазы в ЛС приводит к снижению производства NO и как следствие, к увеличению тонуса и частоты фазных сокращений.

Совместное применение L-NAME и индометацина уменьшало стимулирующий эффект ГК на ЛС, но не отменяло его. При исследовании эндотелий-независимых реакций ЛС на ГК на фоне норадреналина было показано, что дексаметазон оказывал значительно меньший стимулирующий эффект по сравнению с эффектом в физиологическом растворе. На фоне празозина - блокатора α_1 -адренорецепторов стимулирующий эффект ГК на сократительную активность ЛС также был меньшим по сравнению с эффектом в физиологическом растворе. На основании результатов этих экспериментов можно заключить, что ГК в ЛС так же, как и в артериях и в центральной нервной системе ингибируют обратный захват норадреналина и тем самым способствуют повышению тонуса и увеличению частоты фазных сокращений ЛС.

Из литературных источников известно, что дексаметазон стимулирует норадреналин-индуцированное сокращение гладких мышц посредством активации RhoA / Rho киназы. Учитывая эти данные, были проведены исследования участия Rho-киназы в стимулирующем эффекте дексаметазона на ГМК ЛС. В раствор с деэндотелизированными ЛС предварительно вводили ингибитор Rho-киназы – Y-27632, а через 15 минут - дексаметазон. На фоне Y-27632 наблюдалось достоверное уменьшение стимулирующего эффекта дексаметазона. Результаты этих исследований дают основание заключить, что часть стимулирующего эффекта дексаметазона на ЛС реализуется за счет активации сигнального пути RhoA /Rho киназы в ГМК ЛС, что приводит к увеличению скорости фосфорилирования легкой цепи миозина и увеличению силы сокращений ГМК.

Изучение **геномных механизмов действия ГК** на ЛС проводилось в двух вариантах: при 6-часовой инкубации изолированных ЛС в растворе с ЛПС и при моделировании абдоминального сепсиса.

В первой серии исследований сегменты ЛС на протяжении 6 часов инкубировали в физиологическом растворе с ЛПС при температуре +37°C. По истечении этого времени ЛС, обработанные ЛПС, демонстрировали низкий уровень тонуса, частота и амплитуда их фазных сокращений были существенно меньшими по сравнению с контрольными препаратами. В деэндотелизированных ЛС также было зарегистрировано снижение тонуса, уменьшение частоты и амплитуды фазных сокращений, однако изменения параметров были меньшими по сравнению с интактными препаратами. При инкубировании интактных ЛС в растворе с ЛПС и дексаметазоном параметры их сократительной активности изменялись значительно меньше по сравнению с ЛС, инкубируемыми в растворе с ЛПС. В деэндотелизированных ЛС изменения тонуса, частоты и амплитуды в растворе с дексаметазоном также были меньше по сравнению с параметрами сократительной активности деэндотелизированных ЛС, инкубируемых в растворе с ЛПС. Полученные данные мы интерпретируем как доказательство того, что ЛПС оказывает ингибирующее действие как непосредственно на ГМК ЛС, так и опосредованно, через влияние на эндотелиоциты.

Для раскрытия механизмов действия ЛПС на ЛС и протективного действия дексаметазона была проведена серия опытов с добавлением в раствор для инкубации, содержащий ЛПС и селективный ингибитор iNOS - 1400W. В растворе, содержащем 1400W, ЛПС приводил к значительно меньшему ингибированию сократительной активности препаратов, а в растворе, содержащем 1400W и дексаметазон оказывал еще меньший ингибирующий эффект по сравнению с эффектом ЛПС в физиологическом растворе (Рис.7).

В аналогичных экспериментах с применением династата - селективного ингибитора COX-2 также был зарегистрирован меньший ингибирующий эффект ЛПС на ЛС, а в растворе, содержащем династат+дексаметазон изменения параметров сократительной активности ЛС были еще меньшими. Одновременное воздействие 1400W и династата на препараты ЛС, инкубированные в растворе с ЛПС+дексаметазон, не приводили к достоверным изменениям тонуса, амплитуды и частоты фазных сокращений ЛС.

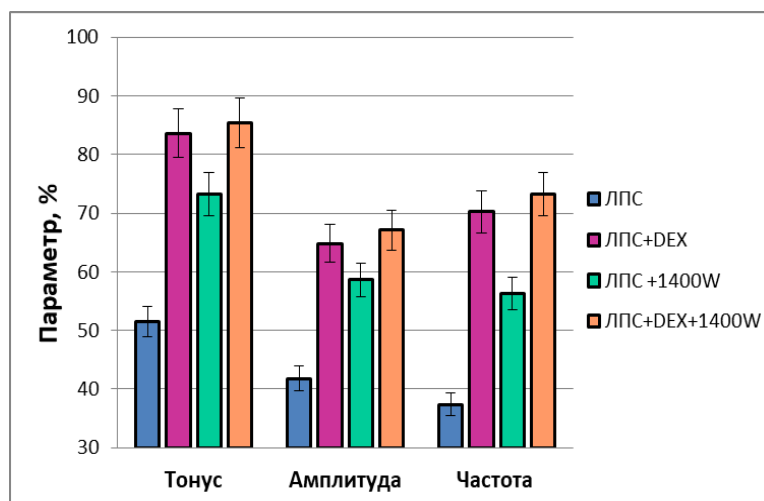


Рис.7. Параметры сократительной активности лимфатических сосудов, инкубированных в растворах, содержащих ЛПС, ЛПС+1400W и ЛПС+1400W+дексаметазон.

Полученные данные свидетельствуют о том, что:

- 1) ЛПС стимулирует в ЛС экспрессию iNOS;
- 2) ЛПС стимулирует в ЛС экспрессию COX-2;
- 3) дексаметазон оказывает протективный эффект на сократительную функцию ЛС при действии ЛПС посредством ингибирования экспрессии iNOS и COX-2.

Во второй серии опытов были изучены **эффекты и механизмы действия дексаметазона на ЛС in vivo**. У крыс моделировали развитие абдоминального сепсиса.

ЛС от септических животных демонстрировали значительное снижение тонуса и параметров фазных сокращений. Максимальное ингибирование сократительной функции наблюдалось в ЛС адреналэктомированных животных с сепсисом. В то же время, в ЛС от септических крыс, которым вводили дексаметазон, регистрировались минимальные изменения тонуса и параметров фазных сокращений. Деэндотелизированные ЛС септических животных также имели пониженный тонус и меньшую частоту и амплитуду фазных сокращений по сравнению с ЛС от контрольных животных.

Применение при исследовании ЛС от септических животных специфического ингибитора iNOS - 1400W привело к выраженному увеличению тонуса, частоты и амплитуды фазных сокращений. Полученные данные позволяют полагать, что важнейшей причиной ингибирования сократительной функции ЛС при сепсисе является экспрессия iNOS. При этом производство NO, ингибирующего сократительную функцию ГМК ЛС, происходит как в эндотелиальных, так и в гладкомышечных клетках ЛС. Ранее экспрессия iNOS в эндотелиоцитах и ГМК кровеносных сосудов при действии провоспалительных цитокинов была выявлена в культуре эндотелиальных клеток брыжеечных артерий мышей и гладкомышечных клеток аорты и артерий крысы, а также *in vivo*. Наличие эндогенных ГК и введение экзогенных (дексаметазона) значительно ослабляло ингибирующее действие сепсиса на ЛС, что дает основание заключить, что дексаметазон оказывает протективный эффект на сократительную функцию ЛС при сепсисе преимущественно посредством подавления экспрессии iNOS.

Поскольку при исследовании геномных эффектов ГК на ЛС *in vitro* было показано, что одним из важнейших механизмов протективного эффекта дексаметазона при действии ЛПС является его способность ингибировать COX-2, были проведены исследования этого механизма *in vivo* на септических животных. Опыты проводились по схеме, аналогичной той, которую применяли при исследовании роли iNOS. В качестве ингибитора COX-2 применяли династат, являющийся высокоселективным ингибитором COX-2. Применение династата приводило к увеличению параметров сократительной активности интактных ЛС от септических животных, в деэндотелизированных ЛС этот эффект был слабо выражен. При применении династата не зарегистрировано достоверных изменений параметров сократительной активности ЛС от животных, которым вводили дексаметазон.

Полученные данные свидетельствуют о том, что у септических крыс тормозный эффект на ЛС оказывают также простаноиды, синтезируемые COX-2. Известно, что при сепсисе в клетках различных органов и тканей значительно возрастает экспрессия COX-2 с образованием простаноидов, обладающих вазодилаторным эффектом. С целью определения вида простаноида, приводящего к подавлению сократительной активности ЛС были проведены эксперименты с использованием антагонистов IP-рецепторов (RO1138452) и EP₄-рецепторов (GW627368X). Применение антагониста IP-рецепторов приводило практически к таким же изменениям параметров сократительной активности ЛУ, как и действие ингибитора COX-2 – династата. В то же время антагонист EP₄-рецепторов - GW627368X при сепсисе оказывал незначительное влияние на параметры сократительной функции ЛС. Данные этих опытов показали, что основным простаноидом, образующимся в ЛС при сепсисе и приводящим к

подавлению их сократительной функции, является PGI₂. Поскольку в деэндотелизированных ЛС династат оказывал слабый и часто статистически недостоверный эффект на параметры сократительной функции ЛС, есть основания полагать, что при сепсисе в ЛС основным продуцентом PGI₂ являются эндотелиальные клетки.

Таким образом, данные последней серии экспериментов дают основание сделать заключение о том, что при сепсисе эндогенные и экзогенные глюкокортикоиды оказывают протективный эффект на транспортную функцию ЛС также путем ингибирования экспрессии COX-2.

При исследовании **негеномных эффектов ГК на ЛУ** было установлено, что гидрокортизон и дексаметазон стимулируют сократительную функцию ЛУ. При их действии увеличивались все параметры сократительной функции ЛУ. Стимулирующий эффект ГК на ЛУ проявлялся медленнее, нежели в ЛС, максимум эффекта регистрировался 15-20 минутам. По аналогии с ЛС, быстрое развитие эффекта дает основание предположить, что на ЛУ здоровых животных ГК оказывают влияние посредством негеномного механизма.

В опытах с применением L-NAME и индометацина было доказано, что стимулирующий эффект ГК на ЛУ реализуется за счет ингибирования NO-синтазы и COX. При этом дексаметазон не вызывал достоверных изменений параметров сократительной активности деэндотелизированных полосок капсулы ЛУ. На основании этих данных можно заключить, что в ЛУ здоровых животных стимулирующий эффект ГК является преимущественно эндотелий-опосредованным и реализуется за счет ингибирования NO-синтазы и COX в эндотелиальных клетках. В физиологических условиях эндотелиальные клетки субкапсулярного синуса ЛУ продуцируют фоновое количество NO и PGI₂, которые оказывают тормозное влияние на ГМК ЛУ. Ингибирование производства этих дилататоров дексаметазоном приводит к достоверному повышению тонуса и параметров фазных сокращений ЛУ.

Блокаторы Ca²⁺-активируемых K⁺-каналов (ТЭА, харибдотоксин и апамин) не приводили к значимым изменениям сократительной активности ЛУ при действии дексаметазона.

Таким образом, данные полученные при исследовании механизмов действия ГК на сократительную функцию брыжеечных ЛУ здоровых животных *in vitro*, позволяют сделать заключение, что их стимулирующий эффект на ЛУ является эндотелий-опосредованным и реализуется за счет ингибирования NO-синтазы и COX.

Поскольку в экспериментах на ЛС было показано, что ГК активируют сократительный процесс в ГМК посредством активации RhoA / Rho-киназы, были проведены подобные эксперименты при исследовании полосок капсулы ЛУ. В раствор с деэндотелизированными

полосками капсулы ЛУ вводили ингибитор Rho-киназы – Y-27632. На фоне Y-27632 регистрировали достоверное снижение стимулирующего эффекта дексаметазона. Эти данные свидетельствуют, что стимулирующего эффект дексаметазона на ЛУ в определенной степени опосредован активацией RhoA/Rho-киназного сигнального пути в ГМК капсулы ЛУ.

Серия экспериментов с инкубацией полосок капсулы ЛУ в растворе с ЛПС была проведена по той же схеме, что и эксперименты с ЛС. В этих опытах было установлено, что ЛПС полностью подавлял фазные сокращения интактных ЛУ на фоне резкого снижения тонуса. В деэндотелизированных препаратах, инкубированных в растворе с ЛПС, тонус также был понижен, но в меньшей степени, фазная сократительная активность сохранялась. Частота и амплитуда фазных сокращений были существенно меньше по сравнению с данными, полученными при изучении ЛУ контрольных животных. Инкубирование ЛУ в растворе, содержащем ЛПС+дексаметазон, сопровождалось незначительным снижением параметров сократительной активности ЛУ.

При изучении механизмов действия ЛПС на ЛУ и механизмов протективного действия дексаметазона была проведена серия опытов с добавлением в экспериментальную камеру, селективного ингибитора iNOS - 1400W. 1400W оказывал выраженный стимулирующий эффект на сократительную активность ЛУ, инкубированных в растворе с ЛПС. В то же время на ЛУ, инкубированные в растворе с ЛПС и дексаметазоном 1400W практически не оказывал эффекта.

Добавление в раствор с ЛУ, инкубированными в растворе с ЛПС, селективного ингибитора COX-2 - династата сопровождалось значительным возрастанием параметров сократительной активности ЛУ (большим по сравнению с эффектом 1400W). При этом династат практически не оказывал влияния на ЛУ, инкубированные в растворе с ЛПС и дексаметазоном.

Результаты экспериментов данной серии приводят нас к следующему заключению:

- инкубация ЛУ в растворе, содержащем ЛПС, приводит к угнетению их сократительной функции;
- ингибирование сократительной активности ЛУ в растворе с ЛПС является эндотелий-зависимым и реализуется за счет экспрессии в эндотелиальных клетках iNOS и COX-2 и повышенным производством NO и PGI₂;
- дексаметазон оказывает протективный эффект на сократительную функцию ЛУ ингибируя экспрессию в ЛУ iNOS и COX-2.

В заключительной серии экспериментов было проведено изучение параметров сократительной активности ЛУ от крыс с абдоминальным сепсисом и механизмов протективного действия дексаметазона на сократительную функцию ЛУ септических животных.

ЛУ от животных с абдоминальным сепсисом в стандартных экспериментальных условиях демонстрировали низкий уровень тонуса и уменьшение амплитуды и частоты фазных сокращений по сравнению с ЛУ от интактных животных. В процессе исследования у части полосок ЛУ удаляли субкапсулярный синус. Дезинтоксигенированные препараты ЛУ имели значительно больший тонус по сравнению с интактными ЛУ септических крыс, амплитуда и частота их фазных сокращений также была выше.

Изучение механизмов действия дексаметазона на сократительную функцию ЛУ септических крыс проводилось по той же схеме, что и ЛС. Первоначально исследовали возможную роль iNOS в ингибировании сократительной функции ЛУ при сепсисе. В раствор, омывающий ЛУ, вводили селективный ингибитор индуцибельной синтазы NO – 1400W. Действие 1400W сопровождалось минимальными изменениями параметров сократительной активности ЛУ от контрольных животных, в то же время ЛУ от крыс с сепсисом демонстрировали существенное повышение тонуса и возрастание частоты и амплитуды фазных сокращений. Эти данные позволили заключить, что часть ингибиторного эффекта на ЛУ у септических животных опосредована экспрессией iNOS. ЛУ от септических животных, которым вводился дексаметазон, имели лучшие параметры сократительной активности. Применение при их исследовании 1400W незначительно повышало тонус и улучшало фазную сократительную активность (Рис.8).

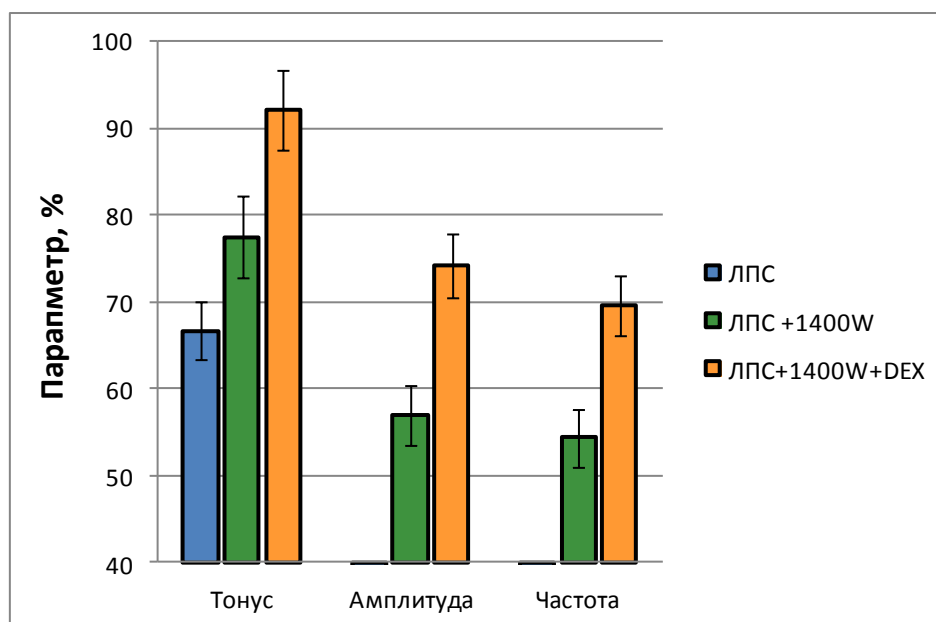


Рис. 8. Параметры сократительной активности лимфатических узлов, инкубированных в растворах, содержащих ЛПС, ЛПС+1400W и ЛПС+1400W+дексаметазон (DEX).

Эксперименты, проведенные по такой же схеме с применением селективного ингибитора COX-2 – династата, показали что часть ингибиторного эффекта на сократительную функцию ЛУ при сепсисе реализуется за счет экспрессии COX-2 и повышенной продукции простагландинов, в частности – PGI₂. ЛУ от септических животных, которым вводился дексаметазон, имели более высокий тонус и большие частоту и амплитуду фазных сокращений.

Таким образом, мы приходим к заключению, что в ЛС и ЛУ эндогенные и экзогенные глюкокортикоиды при сепсисе существенно ингибируют экспрессию iNOS и COX-2 и таким образом сохраняют транспортную функцию ЛС и ЛУ, способствуют улучшению оттока лимфы от воспаленных органов.

ВЫВОДЫ

1. Интерфероны IFN- α -2b, IFN- β -1a и IFN- γ оказывают дозо-зависимый отрицательный хронотропный и инотропный эффект на спонтанные фазные сокращения и тонус лимфатических сосудов и узлов.

2. Механизмы действия IFN- α -2b, IFN- β -1a и IFN- γ на сократительную функцию лимфатических сосудов и лимфатических узлов являются эндотелий-зависимым. Интерфероны при взаимодействии с лимфатическими сосудами и лимфатическими узлами активируют в эндотелиальных клетках NO-синтазу и циклооксигеназу. В лимфатических сосудах преобладает NO-зависимый механизм дилатации, в лимфатических узлах более эффективным является простагландин-опосредованная релаксация.

3. Интерлейкины IL-1 β и IL-2 ингибируют сократительную функцию лимфатических сосудов и лимфатических узлов.

4. Механизмы действия интерлейкинов IL-1 β и IL-2 на сократительную функцию лимфатических сосудов и лимфатических узлов является преимущественно эндотелий-зависимым. IL-1 β реализует ингибирующий эффект посредством усиления продукции NO. IL-2 также стимулирует продукцию эндотелиоцитами лимфатических узлов NO. Помимо этого IL-2 стимулирует в ГМК фосфоинозитидный механизм, приводит к повышению их тонуса. В результате IL-2 приводит к снижению амплитуды и частоты фазных сокращений лимфатических узлов при неизменном уровне тонуса.

5. Глюкокортикоиды в физиологических условиях оказывают быстрый стимулирующий эффект на транспортную функцию лимфатических сосудов и узлов посредством ингибирования эндотелиальной NO-синтазы и циклооксигеназы-1.

6. При воспалении глюкокортикоиды оказывают протективный эффект на сократительную функцию лимфатических сосудов и узлов посредством ингибирования экспрессии индуцибельной NO-синтазы и циклооксигеназы клетками стенки лимфатических сосудов и капсулы лимфатических узлов.

Публикации:

1. Унт Д.В., Лобов Г.И. Пирогенал угнетает сократительную активность лимфатических сосудов и узлов / Д.В. Унт, Г.И. Лобов // Тез. докл. на X Международной конференции «Микроциркуляция и гемореология», г. Ярославль, 5-8 июля 2015. Ярославль, 2015. С. 54.
2. Унт Д.В., Лобов Г.И. Сократительная функция лимфатических сосудов и узлов: эффекты интерлейкина-1 и интерлейкина-2 // Современные проблемы науки и образования. Вып. №5. 2016. URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=25149> (дата обращения: 11.11.2018). **ВАК**
3. Унт Д.В., Лобов Г.И. Транспортная функция лимфатических узлов: эффекты интерлейкина-1 и интерлейкина-2 / Д.В. Унт, Г.И. Лобов. // Тез. докл. на XV Всероссийском совещании с международным участием по эволюционной физиологии посвященным памяти академика Л. А. Орбели и 60-летию Института эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова, г. СПб, 17-22 окт. 2016. СПб, 2016. С. 249.
4. Унт Д.В., Лобов Г.И. Эндотелий-зависимые реакции лимфатических сосудов и узлов / Д.В. Унт, Г.И. Лобов // Тез. докл. на второй международной научно-практической конференции «Экспериментальные и клинические аспекты микроциркуляции и функции эндотелия», г. Смоленск, 16-17 нояб. 2016. Смоленск.2016. С.119-122.
5. Унт Д.В., Лобов Г.И. Ингибиторный эффект интерферонов на сократительную активность брыжеечных лимфатических сосудов и узлов быка / Д.В. Унт, Г.И. Лобов // Бюллетень эксперимент. биологии и медицины». -2017. -Т. 164. №8. -С. 145-149. **ВАК**
6. Унт Д.В., Лобов Г.И. Транспортная функция лимфатических сосудов и узлов при действии интерферонов / Д.В. Унт, Г.И. Лобов // Тез. докл. на Санкт-Петербургском научном форуме 100-летия Физиологического общества им. И.П. Павлова, г. СПб, 17-19 апр. 2017. СПб. 2017. С. 110-111.
7. Унт Д.В., Лобов Г.И. Механизмы действия интерлейкина-1 β и интерлейкина-2 на транспортную функцию лимфатических сосудов и лимфатических узлов / Д.В. Унт, Г.И. Лобов // Журнал фундамент. медицины и биологии. -2017. № 2/2017. -С. 15-19.
8. Унт Д.В., Лобов Г.И. Динамика фазных и тонических сокращений лимфатических сосудов и узлов при действии интерферонов / Д.В. Унт, Г.И. Лобов // Тез. докл. на конференции «Нейрогуморальные механизмы регуляции висцеральных функций в норме и при патологии», г. Томск, 23 мая 2017. Томск. 2017. С. 33.
9. Лобов Г.И., Унт Д.В. Глюкокортикоиды стимулируют сократительную активность лимфатических сосудов и узлов / Г.И. Лобов, Д.В. Унт // Регионарное кровообращен. и микроциркуляция. -2017. -Т. 16. № 4 (64). -С. 73-79. **ВАК**
10. Унт Д.В., Лобов Г.И. Механизмы тормозного действия ИФН- α -2 β на сократительную активность лимфатических сосудов и узлов / Д.В. Унт, Г.И. Лобов // Фундамент. и прикладн. проблемы науки. -2017. -С. 170-175.
11. Унт Д.В. Действие интерферонов на сократительную активность брыжеечных лимфатических сосудов и узлов / Д.В. Унт, Г.И. Лобов // Тез. докл. на XXIII съезде физиологического общества им. И.П. Павлова, г. Воронеж, 18-22 сент. 2017. С. 931-932.

12. Лобов Г.И. Глюкокортикоиды стимулируют сократительную активность лимфатических сосудов и узлов / Г.И. Лобов, Д.В. Унт // Тез. докл. на международном молодежном научном форуме «Ломоносов» МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва, 9-13 апр. 2018. Москва. 2018. С.1-2.
13. Лобов Г.И., Унт Д.В. Протективный эффект дексаметазона на липополисахарид-индуцированное ингибирование сократительной функции изолированных лимфатических сосудов и узлов / Г.И. Лобов, Д.В. Унт // Бюллетень эксперимент. биологии и медицины. -2018. -Т. 165 №: 5. -С. 541-544. ВАР

СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ГК	- глюкокортикоиды
ГМК	- гладкомышечная клетка
ЛС	- лимфатический сосуд
ЛПС	- липополисахарид
ЛУ	- лимфатический узел
ТЭА	- тетраэтиламмония хлорид
СОХ	- циклоксигеназа
СОХ-2	- циклоксигеназа-2
EDHF	- эндотелиальный гиперполяризующий фактор
IFN	- интерферон
iNOS	- индуцибельная NO-синтаза
IL	- интерлейкин
IP ₃	- инозитолтрифосфат
NO	- оксид азота
PGI ₂ ,	- простаглицлин