

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧЕЖДЕНИЕ
НАУКИ
ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ ИМ. И.П. ПАВЛОВА РАН**

На правах рукописи

УНТ ДАРЬЯ ВАЛЕРЬЕВНА

**СОКРАТИТЕЛЬНАЯ ФУНКЦИЯ ЛИМФАТИЧЕСКИХ СОСУДОВ И
УЗЛОВ ПРИ ДЕЙСТВИИ ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ**

03.03.01 – Физиология

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук,
профессор Лобов Г.И.

Санкт-Петербург – 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. СТРОЕНИЕ И ФУНКЦИИ ЛИМФАТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ	
1.1. Лимфатическая система. Структурно-функциональные элементы.....	19
1.1.1. Лимфатические капилляры.....	19
1.1.2. Лимфатические посткапилляры.....	20
1.1.3. Лимфатические сосуды.....	20
1.1.4. Строение лимфангиона.....	21
1.1.5. Лимфатические узлы.....	22
1.2. Функции лимфатической системы.....	23
1.3. Транспортная функция лимфатических сосудов и узлов.....	24
1.4. Сократительная активность лимфатических сосудов и узлов.....	24
1.4.1. Виды сократительной активности лимфатических сосудов и узлов...	25
1.4.2. Тонус лимфатических сосудов и узлов.....	26
1.4.3. Спонтанная фазная сократительная активность лимфатических сосудов и узлов.....	26
1.4.4. Значение спонтанной фазной сократительной активности лимфатических сосудов и узлов.....	27
1.5. Регуляция сократительной активности лимфатических сосудов и узлов.	29
1.5.1. Миогенная ауторегуляция.....	29
1.5.2. Эндотелий-зависимая регуляция.....	30
1.5.3. Влияние вегетативной нервной системы на сократительную активность лимфатических сосудов.....	32
1.5.4. Метаболическая регуляция и регуляция с участием биологически активных веществ.....	33
1.6. Иммуномодуляторы. Функции иммуномодуляторов.....	35
1.6.1. Интерфероны.....	36

1.6.2. Механизм действия интерферонов.....	38
1.6.3. Функции интерферонов и их медицинская значимость.....	38
1.7. Интерлейкины. Классификация интерлейкинов.....	39
1.7.1. Механизм действия интерлейкинов.....	43
1.7.2. Функции интерлейкинов и применение во врачебной практике	44
1.8. Глюкокортикоиды. Эффекты глюкокортикоидных гормонов на иммунную систему, возникающие при физиологической концентрации гормонов в организме.....	44
1.8.1. Механизм действия глюкокортикоидов.....	45
1.8.2. Фармакологические эффекты глюкокортикоидов.....	47
1.8.3. Применение глюкокортикоидов во врачебной практике.....	50
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	52
2.1. Выбор объекта исследования.....	52
2.2. Моделирование перитонита.....	53
2.3. Приготовление препаратов для исследования.....	54
2.4. Солевые растворы: состав, температура, оксигенация.....	57
2.5. Регистрация сократительной активности.....	59
ГЛАВА 3. ВЛИЯНИЕ ИНТЕРФЕРОНОВ НА СОКРАТИТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ЛИМФАТИЧЕСКИХ СОСУДОВ И УЗЛОВ.....	61
3.1. Сократительная функция лимфатических сосудов при действии интерферонов IFN- α -2b, IFN- β -1a и IFN- γ	63
3.2. Механизмы действия интерферонов IFN- α -2b, IFN- β -1a и IFN- γ на сократительную функцию лимфатических сосудов.....	66
3.3. Сократительная функция лимфатических узлов при действии интерферонов IFN- α -2b, IFN- β -1a и IFN- γ	70
3.4. Механизмы действия интерферонов IFN- α -2b, IFN- β -1a и IFN- γ на сократительную функцию лимфатических узлов.....	73
3.5. Резюме.....	78
ГЛАВА 4. ЭФФЕКТЫ И МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ ИНТЕРЛЕЙКИНОВ IL-1β и IL-2 НА СОКРАТИТЕЛЬНУЮ ФУНКЦИЮ ЛИМФАТИЧЕСКИХ	

СОСУДОВ И УЗЛОВ.....	79
4.1. Сократительная функция лимфатических сосудов при действии интерлейкинов IL-1 β и IL-2.....	80
4.2. Механизмы действия интерлейкинов IL-1 β и IL-2 на сократительную функцию лимфатических сосудов.....	83
4.3. Сократительная функция лимфатических узлов при действии интерлейкинов IL-1 β и IL-2.....	86
4.4. Механизмы действия интерлейкинов IL-1 β и IL-2 на сократительную функцию лимфатических узлов.....	90
4.5. Резюме.....	95
ГЛАВА 5. ЭФФЕКТЫ И МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ ГЛЮКОКОРТИКОИДОВ НА СОКРАТИТЕЛЬНУЮ ФУНКЦИЮ ЛИМФАТИЧЕСКИХ СОСУДОВ И УЗЛОВ.....	96
5.1. Негеномные эффекты глюкокортикоидов на лимфатические сосуды и узлы.....	97
5.1.1. Сократительная функция лимфатических сосудов при действии глюкокортикоидов.....	97
5.1.2. Механизмы действия глюкокортикоидов на сократительную функцию лимфатических сосудов.....	99
5.1.3. Сократительная функция лимфатических узлов при действии глюкокортикоидов.....	105
5.1.4. Механизмы действия глюкокортикоидов на сократительную функцию лимфатических узлов.....	106
5.2. Геномные эффекты глюкокортикоидов на лимфатические сосуды и узлы (исследования <i>in vitro</i>).....	110
5.2.1. Влияние липополисахарида на сократительную функцию лимфатических сосудов	110
5.2.2. Влияние липополисахарида на сократительную функцию лимфатических узлов.....	113
5.3. Геномные эффекты глюкокортикоидов на лимфатические сосуды и узлы (исследования <i>in vivo</i>).....	116
5.3.1. Сократительная функция лимфатических сосудов у септических животных при действии глюкокортикоидов.....	117

5.3.2. Механизмы действия глюкокортикоидов на сократительную функцию лимфатических сосудов.....	118
5.3.3. Сократительная функция лимфатических узлов у септических животных при действии глюкокортикоидов.....	122
5.3.4. Механизмы действия глюкокортикоидов на сократительную функцию лимфатических узлов.....	123
5.4. Резюме.....	130
ГЛАВА 6. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	132
ВЫВОДЫ.....	157
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	159
СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	184

ВВЕДЕНИЕ

В организме человека и теплокровных животных лимфатическая система осуществляет ряд жизненно важных функций: резорбционную и транспортную функции, являющиеся ключевыми для поддержания гомеостаза гидростатического и коллоидно-осмотического давления в интерстициальном пространстве; функцию всасывания жира и жирорастворимых витаминов в желудочно-кишечном тракте и доставку их в виде липопротеинов и хиломикронов в кровь [82, 178, 188, 282], а также функцию иммунной защиты [89, 128, 253]. Лимфоток по ЛС в организме теплокровных животных осуществляется посредством двух механизмов – пассивным и активным транспортом. Пассивный транспорт осуществляется за счет внешних сил и хорошо функционирует в органах, подвергающихся периодической компрессии [199]. Активный транспорт лимфы реализуется посредством ритмических сокращений сегментов ЛС – лимфангионов. За счет сокращения ГМК, расположенных в стенке лимфангиона в несколько слоев, давление в его просвете возрастает, дистальный клапан закрывается, проксимальный открывается, и порция лимфы перемещается в проксимальный лимфангион (Рисунок 1).

Активный транспорт лимфы по ЛС хорошо регулируется (имеется несколько контуров регуляции) [92, 165, 170] и, по мнению большинства лимфологов, является основным [92, 189]. Базовым механизмом регуляции лимфотока является саморегуляция, реализуемая ГМК и эндотелиоцитами ЛС [47, 201]. Определенное значение имеет нервная регуляция лимфотока. Помимо этого, множество химических веществ, поступающих в системный кровоток или образующихся непосредственно в тканях при определенных физиологических или патологических обстоятельствах, способны изменять силу и частоту фазных сокращений ЛС, а также уровень их тонического напряжения.

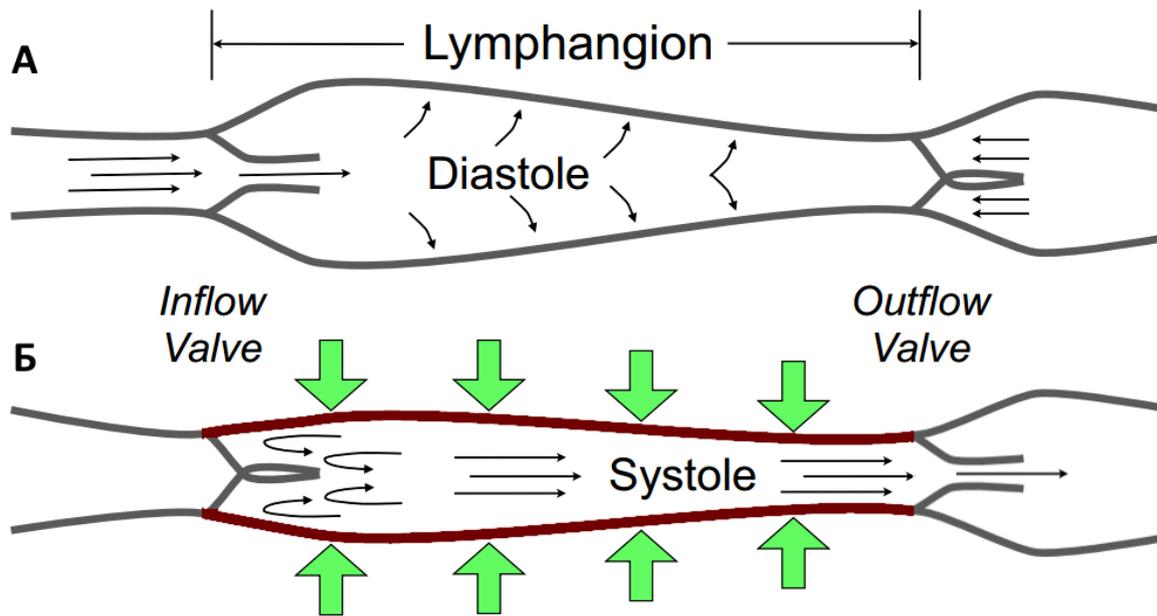


Рисунок 1 – Схема сегмента лимфатического сосуда – лимфангиона: А - в фазе диастолы (заполнения лимфой), Б – в фазе систолы (изгнания лимфы) [92]

По афферентным ЛС лимфа поступает в ЛУ, структура которых более адаптирована для реализации иммунных функций, нежели для транспорта лимфы [49]. ЛУ представляют собой сложные органы, которые содержат скопления специализированных стромальных, миелоидных и лимфоидных клеток. Стромальные элементы образуют основную структуру ЛУ, а именно – капсулу и трабекулы (Рисунок 2). Под капсулой располагается узкое щелевидное пространство, образованное литоральными (эндотелиальными) клетками, формирующими сложную трехмерную сетчатую структуру - субкапсулярный синус. В капсуле ЛУ располагается значительное количество ГМК, расположенных в несколько слоев и ориентированных в разных направлениях. Собственная сократительная активность ЛУ, осуществляемая за счет ритмических сокращений ГМК капсулы ЛУ, играет важную роль в продвижении лимфы по ЛУ [48, 49]. При синхронном сокращении ГМК давление в ЛУ повышается и лимфа медленно просачивается через субкапсулярный синус в медуллярные синусы ЛУ, при этом компоненты лимфы контактируют с эндотелиоцитами, расположенными

на внешней и внутренней поверхности субкапсулярного синуса. Часть лимфы идет в В и Т-фолликулы, где ее компоненты могут задерживаться на несколько часов и даже суток. Затем лимфа перемещается в эфферентные ЛС. Сократительная активность ГМК капсулы ЛУ регулируется посредством разнообразных механизмов, в т.ч. и биологически активными веществами, поступающими с лимфой или кровью, или образующимися различными клетками ЛУ.

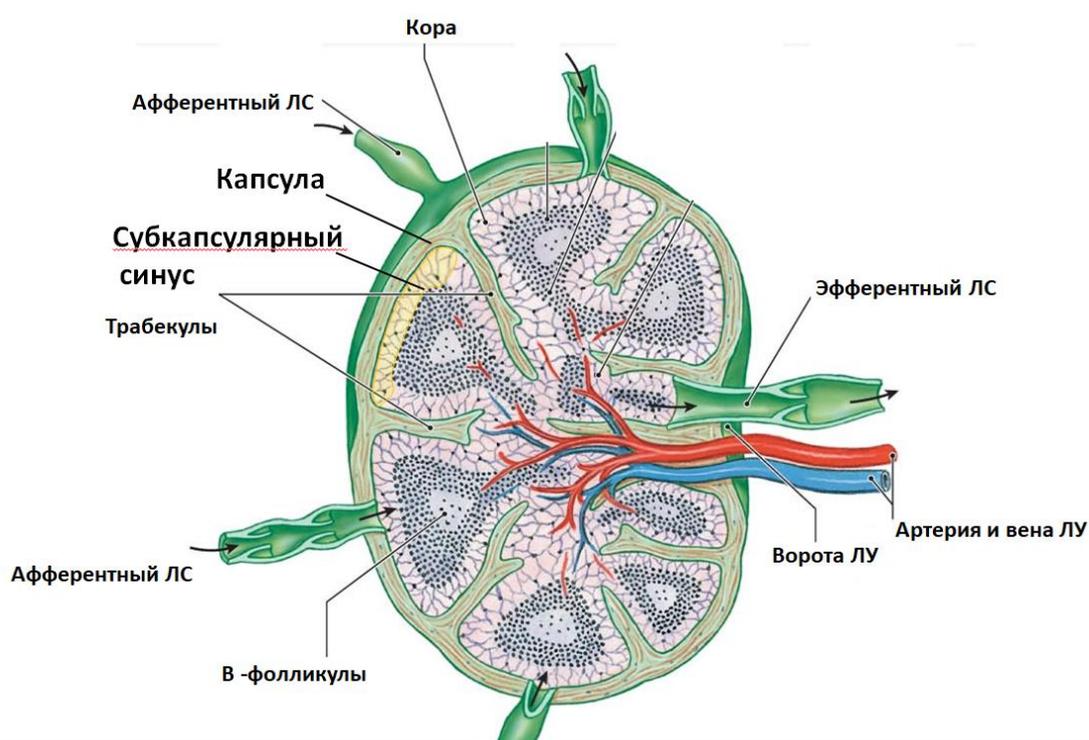


Рисунок 2 – Лимфатический узел в разрезе. Показаны основные структуры лимфатического узла, имеющие отношение к транспорту лимфы

Актуальность исследования

В вышеуказанном перечне функций лимфатической системы иммунная функция стоит на третьем месте, но это не значит, что эта функция менее значима, чем другие; возможно, ее следовало поставить на первое место.

Патогены после внедрения в организм через кожу или слизистые поступают в лимфатические капилляры и затем – в ЛС. Уже на этом уровне лимфатическая система может модулировать иммунный ответ. Установлено, что эндотелиальные клетки лимфатических капилляров и ЛС при взаимодействии с антигенами и периферийными дендритными клетками, выделяют вещества, замедляющие лимфоток, что способствует созреванию дендритных клеток [128, 223]. Вместе с антигенами и антигенпрезентирующими клетками в лимфу из воспаленных тканей поступает множество цитокинов и хемокинов [169], оказывающих воздействие на эндотелиальные и ГМК ЛС и модулирующих таким образом скорость лимфотока и доставки антигенов в ЛУ.

По афферентным ЛС антигены и антигенпрезентирующие клетки в составе лимфы поступают в ЛУ. ЛУ, помимо вышеописанных специализированных стромальных элементов, содержат значительное количество миелоидных и лимфоидных клеток. ЛУ являются критическим местом, где контактируют антигены, стромальные макрофаги и лимфоциты, в них инициируются адаптивные иммунные реакции [142]. Концентрируя антигены, активированные антигенпрезентирующие клетки из периферических тканей, а также пул циркулирующих лимфоцитов, ЛУ осуществляют активацию и клональное размножение АГ-специфических Т- и В-клеток. Первоначально лимфа входит в субкапсулярный синус ЛУ, в котором расположены «субкапсулярные пролиферативные центры», в которых плотно упакованы В-клетки памяти, Т-хелперы и субкапсулярные макрофаги [194]. По мнению авторов, субкапсулярные пролиферативные центры являются структурами иммунологической памяти, подготовленными для быстрой активации вторичных иммунных реакций. Таким образом, иммунные реакции в ЛУ запускаются раньше, чем антигены и антигенпрезентирующие клетки окажутся в В- и Т-фолликулах ЛУ.

Различные химические вещества, принесенные из воспалительного очага в субкапсулярный синус с лимфой, и продуцируемые различными клетками ЛУ в процессе иммунных реакций [86], оказывают выраженное влияние на

эндотелиальные клетки субкапсулярного синуса и ГМК капсулы ЛУ, изменяя амплитуду и частоту сокращений последних и оказывая, таким образом, влияние на активную транспортную функцию ЛУ, задержку антигенов и антигенпрезентирующих клеток в ЛУ и выход из ЛУ лимфоцитов.

Таким образом, 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 ЛС способны замедлять или ускорять лимфоток, изменяя, таким образом, скорость доставки антигенов в ЛУ; 3) эндотелиальные клетки ЛУ осуществляют представление антигена лимфоцитам; 4) ЛУ, изменяя силу и частоту сокращений, регулируют выход лимфоцитов из лимфатических узлов, 5) эфферентные ЛС, изменяя тонус, частоту и амплитуду фазных сокращений, регулируют скорость доставки лимфоцитов в системный кровоток [106, 163, 184].

Как уже указывалось выше, в регуляции транспортной функции ЛС и ЛУ принимают участие различные биологически активные вещества, поступающие из очага воспаления и продуцируемые эндотелиальными и другими клетками ЛС и ЛУ и, 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 опухолей [218, 219]. Являясь низкомолекулярными белками, они применяются, преимущественно, парентерально и по причине достаточно высокой молекулярной массы, всасываются исключительно в лимфатические капилляры и в дальнейшем проходят по ЛС в ЛУ. Поскольку ГМК и эндотелиальные клетки имеют рецепторы к интерферонам I типа [117], то, последние оказывают влияние на их функции. Интерфероны альфа-2b, бета-1a и гамма являются официальными

препаратами группы иммуномодуляторов. Длительность лечения интерферонами может достигать 2-месяцев. Несмотря на достаточно широкое клиническое использование, действие интерферонов на активную транспортную функцию ЛС и ЛУ до настоящего времени не изучено.

Вторая группа естественных иммуномодуляторов – это интерлейкины, синтезируемые в основном Т-клетками, а также мононуклеарными фагоцитами и некоторыми другими клетками иммунной системы. Интерлейкины выполняют разнообразные функции, но большинство их стимулирует другие клетки для деления или дифференцировки. Функции интерлейкинов часто реализуются посредством усиления продукции других физиологически активных пептидов и гормонов. ИЛ-1 β индуцирует хемотаксис полиморфноядерных лейкоцитов и макрофагов, стимулирует дифференцировку и пролиферацию В-клеток, стимулирует пролиферацию эндотелиальных клеток. ИЛ-2 синтезируется хелперными Т-клетками и стимулирует различные иммунные реакции, в частности, обеспечивает быстрое размножение и последующую дифференцировку наивных Т-клеток до зрелых эффекторов.

ИЛ-1 β и ИЛ-2 используются в современной врачебной практике. Интерлейкин-1 β (фармакопейное название – беталейкин), являющийся провоспалительным цитокином с множеством функций, часто используется как стимулятор гранулопоэза. Он рекомендован к применению при лечении сепсиса, при вторичных иммунодефицитах, при злокачественных новообразованиях. Интерлейкин-2 (фармакопейное название – ронколейкин) является плеiotропным цитокином, но преимущественно он оказывает влияние на механизмы врождённого иммунитета (NK-клетки и моноциты) и на адаптивный антиген-зависимый иммунный ответ, реализующийся через Т- и В-лимфоциты. Применяется в комплексной терапии гнойно-воспалительных и инфекционных заболеваний (перитонит, панкреатит, остеомиелит, гепатит С и др.), в иммунохимиотерапии и для профилактики вторичного иммунодефицита

Интерлейкины так же, как и интерфероны, являются высокомолекулярными соединениями и применяются в виде подкожных, внутримышечных или внутривенных инъекций. Всасываются интерлейкины исключительно в лимфатические капилляры и транспортируются по ЛС в ЛУ, оказывая влияние на эндотелиальные клетки и ГМК этих структур. Их действие на транспорт лимфы по ЛС и ЛУ также не изучалось.

Третью группу веществ, эффекты которых на транспортную функцию ЛС и ЛУ мы исследовали в данной работе, нельзя отнести исключительно к иммуномодуляторам. Глюкокортикоиды относятся к классическим гормонам, синтезируются, главным образом, в *zona fasciculata* коры надпочечников и регулируют различные метаболические и гомеостатические функции. Они играют жизненно важную роль в регуляции артериального давления, оказывая разрешительный эффект и потенцируя вазоактивные реакции на катехоламины через глюкокортикоидные рецепторы. Глюкокортикоиды оказывают множественное влияние на развитие плода, в т.ч. созревание легких, рост и развитие гиппокампа, миндалина и лобные доли. Глюкокортикоиды также поддерживают развитие почечной системы новорожденных. У взрослых глюкокортикоиды оказывают значительное влияние на внимание, познавательную деятельность и память [145, 217].

Глюкокортикоиды являются важнейшей составной частью механизма обратной связи в иммунной системе, в частности посредством регуляции процесса воспаления. Они используются в медицине при лечении заболеваний, вызванных гиперактивностью иммунной системы, таких как аллергия, астма, аутоиммунные заболевания и сепсис [80]. Глюкокортикоиды ингибируют развитие некоторых видов раковых клеток, поэтому используются в высоких дозах для лечения рака, лимфом и лейкозов [196].

Глюкокортикоиды оказывают влияние на клетки путем связывания с глюкокортикоидным рецептором. Глюкокортикоидные рецепторы обнаружены практически во всех клетках организма, в т.ч. и в клетках органов лимфатической

системы [130]. Однако к настоящему времени в литературе нет данных о влиянии глюкокортикоидов на транспорт лимфы лимфатическими сосудами и узлами.

Таким образом, интерфероны, интерлейкины и глюкокортикоиды являются естественными модуляторами иммунных реакций и воспаления. Некоторые из них, и в частности, интерфероны α -2b, β -1a и γ интерлейкины IL-1 β и IL-2, гидрокортизон и дексаметазон, широко применяются в клинической практике, в т.ч. и при тяжелых формах патологии: аутоиммунных заболеваниях, некоторых видов новообразований, сепсисе. Все они осуществляют модуляцию иммунных реакций преимущественно в структурах лимфатической системы – лимфатических капиллярах, ЛС и ЛУ. И если их эффекты на иммунные реакции в значительной степени изучены [28, 67, 119, 144, 261], то действие на транспортную функцию ЛС и ЛУ не изучалось, что и послужило основанием для проведения данного исследования.

Цель исследования

Исследовать сократительную функцию ЛС и ЛУ при действии интерферонов, интерлейкинов и глюкокортикоидов и механизмы их действия на эндотелиальные и гладкомышечные клетки ЛС и ЛУ.

Задачи исследования:

1. Изучить изменения частоты и амплитуды фазных сокращений и тонического напряжения ЛС и ЛУ 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 ЛС и ЛУ.
3. Исследовать параметры сократительной активности ЛС и ЛУ при действии интерлейкинов IL-1 и IL-2.
4. Определить механизмы действия интерлейкинов IL-1 и IL-2 на сократительную функцию ГМК ЛС и ЛУ.

5. Изучить кратковременные и долговременные эффекты глюкокортикоидов на фазную и тоническую сократительную активность ЛС и ЛУ.
6. Проанализировать негеномные и геномные эффекты глюкокортикоидов на сократительную функцию ГМК ЛС и ЛУ.

Объект и предмет исследования

Объектом исследования служили брыжеечные лимфатические сосуды и узлы быка (56 и 42 штук, соответственно от 32 животных) и крысы линии Wistar (36 ЛС и 43 ЛУ от 36 крыс). Предметами исследования в нашей работе были: 1) тонус ЛС и ЛУ при применении интерферонов, интерлейкинов и глюкокортикоидов, 2) амплитуда и частота фазных сокращений ЛС и ЛУ при действии интерферонов, интерлейкинов и глюкокортикоидов и 2) механизмы действия интерферонов, интерлейкинов и глюкокортикоидов на эндотелиальные и гладкомышечные клетки ЛС и ЛУ.

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.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Интерфероны IFN- α -2b, IFN- β -1a и IFN- γ угнетают сократительную активность ЛС и ЛУ. Основным механизмом ингибиторного действия интерферонов в ЛС заключается в активации эндотелиальной NO-синтазы. В ЛУ ингибирующее действие интерферонов реализуется за счет стимуляции эндотелиальной NO-синтазы и циклооксигеназы.

2. Интерлейкин-1 β ингибирует сократительную активность ЛС и ЛУ посредством стимуляции эндотелиальной NO-синтазы, что приводит к увеличению продукции NO и расслаблению ГМК.

3. IL-2 активирует эндотелиальную NO-синтазу, приводя к расслаблению ГМК ЛС и ЛУ. Вместе с тем IL-2 стимулирует фосфоинозитидный механизм в ГМК капсулы ЛУ, приводя к повышению их тонуса.

4. Глюкокортикоиды в физиологических условиях стимулируют сократительную активность ЛС и ЛУ, что проявляется в повышении тонуса и увеличении частоты и амплитуды их фазных сокращений. Механизм действия

глюкокортикоидов является эндотелий-опосредованным, реализуется за счет ингибирования эндотелиальной NO-синтазы и циклооксигеназы.

5. При воспалении глюкокортикоиды оказывают выраженный протективный эффект на сократительную функцию ЛС и ЛУ посредством ингибирования экспрессии индуцибельной NO-синтазы и циклооксигеназы-2.

Теоретическая и практическая значимость результатов исследования

- изучены эффекты интерферонов IFN- α -2b, IFN- β -1a, 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 ЛС и ЛУ посредством торможения активности эндотелиальной NO-синтазы и циклооксигеназы;

- показано, что при воспалении глюкокортикоиды оказывают протективный эффект на ЛС и ЛУ 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.

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 %.

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 14 печатных работ: 5 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.

Объем и структура работы

Диссертация изложена на 184 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 39 рисунками.

ГЛАВА 1

СТРОЕНИЕ ЛИМФАТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ

1.1. Лимфатическая система. Структурно-функциональные элементы

Лимфатическая система представляет собой сложный комплекс различных структур, выполняющих разнообразные функции. С одной стороны, лимфатическая система представляет собой специализированный дренажный отдел сердечно-сосудистой системы, коллатеральный к венам, состоящий из лимфатических капилляров, посткапилляров, лимфатических сосудов и узлов [32]. С другой – лимфатическая система является самостоятельной системой и включает в себя, помимо вышеперечисленного, еще и тимус, пейеровы бляшки, миндалины, селезенку и красный костный мозг [263, 264].

1.1.1 Лимфатические капилляры

Лимфатические капилляры (ЛК) являются начальным звеном лимфатической системы. ЛК начинаются слепо, представляют собой систему уплощенных эндотелиальных трубок, которые анастомозируют друг с другом, образуя лимфокапиллярные сети [22, 73]. Стенка ЛК состоит из одного слоя плоских эндотелиальных клеток, неплотно соединенных друг с другом. На своей наружной поверхности эндотелиальные клетки образуют отростки, которые особыми выростами – филаментами крепятся к расположенным рядом тканям [22, 88, 131]. Наличие филаментов препятствует спадению ЛК в условиях низкого уровня лимфообразования, и, как следствие, низкого уровня трансмурального давления [2, 99].

Эндотелиальные клетки ЛК располагаются черепицеобразно, что позволяет жидкости поступать из интерстициального пространства в лимфатические сосуды (ЛС), одновременно препятствуя ее выходу обратно [2, 22, 131]. Такое строение эндотелиальных клеток стенки ЛК получило название «первичных» клапанов

лимфатической системы [88, 131, 238]. При повышении интерстициального давления межэндотелиальные отверстия увеличиваются и позволяют большему количеству жидкости из тканей проникать в ЛК. Лимфообразование в ЛК осуществляется в результате резорбции воды, белка и других веществ из интерстициального пространства за счет ритмически изменяющихся градиентов гидростатического и коллоидно-осмотического давления [2, 100].

1.1.2. Лимфатические посткапилляры

Лимфатические посткапилляры (ЛПК) - промежуточное звено между ЛК и ЛС. В стенках ЛПК появляется прерывистая базальная мембрана - тонкий слой соединительной ткани под эндотелием и первые клапаны. ЛПК отличается от ЛК наличием клапана в виде складки стенки. В ЛПК находятся клапаны-шлюзы, типичные полулунные клапаны появляются только в ЛС [8]. Посткапилляры идут чаще всего вдоль собирательных венул (сателлитные) или реже самостоятельно (аберрантные) и продолжают в ЛС I порядка [32, 284].

1.1.3. Лимфатические сосуды

Строение ЛС зависит от его локализации по отношению к лимфотоку. В стенке мелких ЛС появляются одиночные гладкомышечные клетки (ГМК), затем отдельные пучки ГМК и в последующем формируется слой ГМК [85]. В ЛС большего диаметра выделяют три оболочки: внутреннюю, среднюю и наружную [55]. Внутренняя оболочка представлена слоем эндотелиоцитов, под которыми расположен тонкий субэндотелиальный слой, состоящий из соединительной ткани и внутренней эластической сети [74]. Среднюю оболочку образуют расположенные в два слоя ГМК, имеющие циркулярное и косое направление, и эластические волокна [10]. Мышечные волокна имеют различное направление хода и толщину, их количество в средней оболочке варьируемо. Наружная оболочка лимфатических сосудов образована рыхлой волокнистой неоформленной соединительной тканью. В ней определяются продольные пучки

ГМК, а также эластические и коллагеновые волокна. Коллагеновые волокна присутствуют во всех трех оболочках. Эластические и коллагеновые волокна внутренней, средней и наружной оболочек непосредственно связаны между собой и образуют единый каркас стенки сосуда. Отдельные эластические волокна и пучки коллагеновых волокон переходят из адвентиции в окружающую сосуд соединительную ткань [7]. В местах сужения ЛС локализуются клапаны, которые препятствуют ретроградному току лимфы [55]. Именно наличие клапанов позволило сформировать представление о структурно-функциональной единице лимфатического сосуда впоследствии получившей название лимфангион или клапанный сегмент [10].

1.1.4. Строение лимфангиона

Лимфангион представляет собой участок ЛС между двумя клапанами. С позиции теории лимфангиона в стенке сосуда принято выделять три различных в функциональном плане участка [14]. Первый – мышечная манжетка, которая расположена в средней части лимфангиона и содержит значительное количество ГМК [12]. В области мышечной манжетки стенка лимфангиона имеет наибольшую толщину. ГМК, расположенные в области мышечной манжетки, при их синхронном сокращении обеспечивают систолу лимфангиона [58, 59]. Второй участок – несокращающаяся или слабо сокращающаяся часть лимфангиона – расположен над клапаном и содержит небольшое количество мышечных элементов, а также сам клапан, как правило, двустворчатый. Клапан состоит из истонченной безмышечной створки и клапанного валика (место перехода створки в стенку лимфангиона) [284]. Третья часть лимфангиона – это область клапанного синуса, расширение, расположенное проксимальнее клапана. Это наиболее тонкая часть стенки, содержащая единичные пучки ГМК и соединительнотканые белки, среди которых преобладает эластин [15].

1.1.5. Лимфатические узлы

Лимфатические узлы (ЛУ) представляют собой образования округлой, овальной, бобовидной, реже лентовидной формы размерами от 0,5 до 30 мм и более. ЛУ располагаются на пути следования внеорганных лимфатических сосудов. ЛС в количестве двух-четырех, приносят лимфу к регионарным ЛУ и перфорируют их капсулу обычно в косом направлении на выпуклой стороне ЛУ. Миоциты ЛС переходят в капсулу, а эндотелий сосудов переходит в эндотелий краевого синуса ЛУ [13]. Капсула, покрывающая ЛУ, преимущественно состоит из соединительно-тканых элементов, между которыми располагаются слои гладкомышечных клеток, ориентированные в разных направлениях [2, 18].

Ткань лимфатического узла состоит из наружного кортикального слоя, в котором скопления клеток образуют фолликулы, частично с зародышевыми центрами, и внутреннего мозгового слоя с меньшим содержанием лимфоцитов в сочетании с макрофагами, которые сосредоточены по ходу лимфатических синусов. Такая структура ЛУ дает возможность свободной циркуляции и рециркуляции лимфоцитов между лимфой, кровью и тканями. [13, 63, 134]

ЛУ имеет сложную внутреннюю организацию. Под капсулой располагается субкапсулярный синус, а лимфоидная ткань, составляющая 70-80% объема узла, пронизана многочисленными мозговыми синусами. Литоральные клетки, формирующие выстилку синусов, имеют множество отростков и совместно с ретикулярными клетками в просвете синуса формируют сложную трехмерную сеть, через которую медленно протекает лимфа. [134, 215]

Благодаря наличию миоцитов в капсуле и трабекулах ЛУ обладает сократительной активностью и является одним из активных участников лимфотока [18, 19]. Лимфа покидает узел через выносящие сосуды, которые локализуются в области его ворот на стороне, противоположной входу входящих сосудов.

1.2. Функции лимфатической системы

Лимфатическая система выполняет ряд жизненно важных функций, способствующих поддержанию гомеостаза внутренней среды [32]. Резорбтивная функция обеспечивает резорбцию из интерстиция избытка жидкости и белков, вышедших в него из кровеносного русла и неспособных вновь вернуться в кровотоки через кровеносные капилляры, с последующей транспортировкой их по ЛС в венозную систему [2]. Через поры в ЛК всасываются продукты переваривания жиров и жирорастворимые витамины, коллоидные вещества, крупномолекулярные соединения, лекарственные препараты. Таким образом, резорбтивная, дренажная и транспортная функции являются ключевыми для поддержания оптимального гидростатического давления и баланса белка в интерстициальном пространстве [16, 282].

Лимфатическая система является барьером на пути инфекционных агентов и токсинов из интерстициального пространства в системный кровоток [276]. Барьерная функция лимфатической системы осуществляется за счет ЛУ, в которых задерживаются бактерии и фрагменты их мембран, опухолевые клетки, кроме того в ЛУ осуществляется гемопоэз [18]. Иммунобиологическая функция также реализуется в ЛУ, где происходит контакт антигенов и дендритных клеток с Т- и В-лимфоцитами, после чего здесь же происходит их преобразование в плазматические клетки, вырабатывающие антитела [29, 146, 283].

Транспорт жидкости ЛС является важным условием оптимальной гидратации тканей. Лимфатическая система в целом осуществляет контроль жидкостно-макромолекулярного равновесия интерстициального пространства. Лимфатическое сосудистое ложе и всю систему в целом ранее рассматривали в качестве вспомогательного дренажного канала, дополнения к венозной системе [32]. Однако дренажная функция заключается не просто в сбросе избытка

жидкости, важнейшим процессом является фильтрация лимфы и задержка патологических макромолекул и инородных частиц в ЛУ [20].

1.3. Транспортная функция лимфатических сосудов и узлов

Движение лимфы начинается с момента ее образования в ЛК, поэтому факторы, которые увеличивают скорость фильтрации жидкости из кровеносных капилляров, также увеличивают скорость образования и движения лимфы. Образование лимфы в значительной мере зависит от величины поверхности и от проницаемости стенок капилляров. По мере поступления лимфы из ЛК в мелкие ЛС происходит наполнение лимфангионов лимфой и растяжение их стенок, что приводит к возбуждению и сокращению ГМК мышечной манжетки. Сокращение ГМК в стенке лимфангиона повышает внутри него давление до уровня, достаточного для закрытия дистального клапана и открытия проксимального. В результате происходит перемещение лимфы в следующий центрипетальный лимфангион. Заполнение лимфой проксимального лимфангиона приводит к растяжению его стенок, возбуждению и сокращению ГМК и перекачиванию лимфы в следующий лимфангион. Таким образом, последовательные сокращения лимфангионов приводят к перемещению порции лимфы по лимфатическим коллекторам до места их впадения в венозную систему [7, 58, 85].

ЛУ являются значительным препятствием для продвижения лимфы. Синусы ЛУ пронизаны отростками литоральных клеток, формирующих сложную трехмерную сеть [6, 14], которая существенно увеличивает гидродинамическое сопротивление узлов. В капсуле ЛУ присутствует значительное количество ГМК [69]. Посредством изменения активности миоцитов лимфатические узлы имеют возможность регулировать поступление или задержку поступления в кровь инородных частиц, бактерий, токсинов и лимфоцитов.

1.4. Сократительная активность лимфатических сосудов и узлов

1.4.1. Виды сократительной активности лимфатических сосудов и узлов

При изучении сократительной деятельности гладких мышц мышечной манжетки лимфангиона были обнаружены две формы моторики: фазные ритмические сокращения и тоническое напряжение, уровень которого может спонтанно изменяться [93, 227]. Благодаря фазным сокращениям лимфатический сосуд осуществляет пропульсивную функцию, уровень тонуса определяет емкостную характеристику лимфангиона и гидродинамическое сопротивление данного участка лимфотока [54].

В зависимости от преобладания одной из форм сократительной активности выделяют два основных типа лимфангионов. Первый тип насосный – осуществляет спонтанные фазные ритмические сокращения подобно сердцу. Для другого типа лимфангионов, который выполняет емкостную функцию, более характерная форма моторики – тонические реакции [15].

К настоящему времени достаточно хорошо изучены параметры спонтанной активности лимфатических сосудов и их сегментов – лимфангионов. Использование метода прямой регистрации позволило установить, что *in vivo* ЛС разного диаметра у разных животных сокращаются с частотой от 2 до 28 сокращений в минуту [11, 54, 55, 155, 212, 281].

Значения амплитуды одиночных фазных сокращений лимфангионов также варьируют от 0,1-0,3 мН для брыжеечных ЛС белой крысы до 2–20 мН для брыжеечных ЛС быка и определяются степенью развития мышечного слоя в стенке ЛС [212].

Современные исследования сократительной активности ЛУ показывают, что частота и амплитуда спонтанных фазных сокращений гладкомышечных клеток капсулы значительно варьирует и зависит от степени их растяжения.

1.4.2. Тонус лимфатических сосудов и узлов

В ЛС и ЛУ выявляется базальный тонус – тоническое сокращение ГМК без каких-либо воздействий. Возникновение этого тонуса обусловлено особенностями набора ионных каналов на мембране ГМК. Некоторые кальциевые каналы открыты в состоянии покоя, что обеспечивает приток внешнего Ca^{2+} и длительную активацию сократительного аппарата миоцитов. Известно, что для ЛС и ЛУ характерны медленные волны тонуса (0,5 - 2 в мин). Регуляция тонических сокращений ЛС и ЛУ осуществляется с помощью нервных и гуморальных механизмов.

1.4.3. Спонтанная фазная сократительная активность лимфатических сосудов и узлов

ЛС обладают спонтанной фазной активностью, т.е., способностью генерировать потенциалы действия и, в результате, осуществлять ритмические сокращения при отсутствии внешних воздействий [176]. Было установлено, что фазные сокращения ЛС инициируются одиночными потенциалами действия, свойства которых по ряду параметров сходны с потенциалами действия клеток миокарда [3, 46].

Остается актуальным вопрос о природе пейсмекера в лимфангионе. Выдвинут ряд теорий, среди которых наиболее широкое признание получила миогенная теория, согласно которой источником спонтанной активности являются сами миоциты, обладающие особыми свойствами мембраны. Пейсмекеры характеризуются большим содержанием митохондрий по сравнению с не обладающими автоматией ГМК и локализуются преимущественно в мышечной манжетке [87, 190]. В 1993 году Van Helden D.F. доказал миогенную природу пейсмекеров посредством регистрации потенциалов действия в условиях денервации и удаления эндотелия [268]. По общему мнению исследователей,

лимфангионы способны проявлять сократительную активность в отсутствии влияния нервных и гуморальных факторов.

1.4.4. Значение сократительной активности лимфатических сосудов и узлов для регуляции иммунного ответа

Лимфатическая сеть участвует в запуске и развитии иммунного ответа. С иммунологической точки зрения лимфоток, обеспечиваемый за счет активных сокращений ЛС, является процессом доставки антигенов и антигенпрезентирующих клеток в ЛУ. В норме собранная лимфа состоит из межклеточной жидкости и содержит пул аутоантигенов, возникающих в результате метаболизма и естественной гибели клеток [105]. Аутоантигены из лимфы могут частично активировать дендритные клетки и эти антигенпрезентирующие клетки играют важную роль в поддержании периферической толерантности [113].

Началом процесса запуска иммунного ответа служит проникновение чужеродного антигена во внутреннюю среду организма. Это происходит при травмировании покровных тканей, при этом в них выделяются стресс-протеины, белки теплового шока, цитокины кератиноцитов и клеток соединительной ткани, все они относятся к медиаторам доиммунного воспаления. Проникший в покровы патоген сорбируют и поглощают эндоцитозом дендритные клетки, фагоцитируют макрофаги. Дендритные клетки обладают способностью мигрировать из покровов вместе с антигеном по ЛС в региональные ЛУ. Продвигаясь с током лимфы в ЛУ дендритные клетки процессируют антиген, экспрессируют на мембране комплексы пептидов с молекулами МНС-I и МНС-II и необходимые корцепторные молекулы, с помощью которых они смогут вступить в эффективное воздействие с Т-лимфоцитами в Т-зависимых зонах ЛУ. В Т-зависимых зонах ЛУ дендритные клетки представляют антиген (в комплексе с МНС-II) интенсивно мигрирующим Т-лимфоцитам. В случае достаточного

корцепторного взаимодействия с антигенпрезентирующей клеткой Т-лимфоцит получает активационный сигнал, и с этого момента начинается собственно иммунный - лимфоцитарный ответ [106, 113, 163, 247].

Таким образом, можно заключить, что лимфатическая система может контролировать скорость, силу и длительность иммунного ответа несколькими путями, которые включают в себя:

- 1) вход антигенов и антигенпрезентирующих клеток в ЛК,
- 2) регулируемый транспорт антигенов и антигенпрезентирующих клеток по афферентным ЛС,
- 3) представление антигена лимфатическим эндотелиальным клеткам и лимфоцитам в ЛУ,
- 4) выход лимфоцитов из ЛУ [106, 163].

ЛС не только запускают адаптивный иммунный ответ, но и участвуют в управлении иммунным ответом посредством модуляции иммунологического микроокружения дренирующего ЛУ, обеспечивая транспортный механизм не только для антигена, но и для эндогенных иммуномодуляторов, продуцируемых в воспаленных периферических тканях [168]. Запуск и развитие адаптивных иммунных реакций в ЛУ приводит к их быстрому ремоделированию (значительному увеличению объема с сохранением сложной внутренней структуры) [79]. Увеличение вместимости ЛУ для размещения увеличенного объема афферентной лимфы, рекрутирования наивных лимфоцитов и облегчения их встречи с антигенами и антигенпрезентирующими клетками имеет решающее значение для осуществления иммунного надзора [233]. Одновременно с увеличением количества входящих в воспаленный ЛУ иммунных клеток задерживается выход из него лимфоцитов, что существенно увеличивает шанс встречи антигенспецифических лимфоцитов с родственными антигенами [110]. По завершении иммунного наблюдения наивные Т-лимфоциты, а также активированные антигеном эффекторные клетки и клетки памяти выходят из региональных ЛУ через эфферентные ЛС, попадают в системную циркуляцию, а

оттуда - в очаг воспаления в месте проникновения или диссеминации антигена [110, 147].

1.5. Регуляция сократительной активности лимфатических сосудов

К настоящему моменту общепризнано, что параметры моторики лимфангионов зависят от ряда факторов: уровня лимфообразования в конкретном лимфатическом регионе, воздействия нервных и гуморальных факторов, а также морфологического и функционального состояния лимфангионов [17, 93, 273, 282].

1.5.1 . Миогенная ауторегуляция

Миогенная или ауторегуляция является основным видом регуляции сократительной активности миоцитов лимфангионов, которая реализуется посредством активации механочувствительных кальциевых каналов наружной мембраны [42,200]. Изучение механизма стимулирующего влияния механического воздействия показало, что растяжение ЛС вызывает инактивацию калиевых каналов и преобладание входящего кальциевого тока, что вызывает возбуждение клеток. Увеличение трансмурального давления вызывает увеличение амплитуды и длительности ПД, что приводит к росту амплитуды и длительности сокращения ЛС [43].

Систола дистального лимфангиона приводит к наполнению проксимального, растяжению его стенки и возбуждению ГМК. В результате наблюдается последовательное сокращение цепочки лимфангионов, которое приводит к продвижению лимфы в проксимальном направлении [280]. Наблюдения *in vivo* и *in vitro* показывают, что эта форма моторики является наиболее распространенной для ЛС [187]. Ауторегуляция в нормальных условиях обеспечивает соответствие параметров сократительной активности ЛС уровню

лимфообразования в органах и тканях, что позволяет поддерживать постоянство гидростатического давления в интерстициальном пространстве [42, 43, 200, 285].

В перфузируемых пренодальных ЛС быка увеличение трансмурального давления от 3 до 6 см водного столба вызывает увеличение силы фазных сокращений без статистически значимых хронотропных реакций. Пропульсионная способность достигает своего максимума при величине трансмурального давления 6-9 см водного столба и незначительно снижается при увеличении давления до 15 см водного столба. В постнодальных ЛС быка снижение транспортной функции наблюдается при трансмуральном давлении более 10 см. водного столба [101].

1.5.2. Эндотелий-зависимая регуляция

Эндотелиальные клетки образуют внутреннюю выстилку сосудов, по этой причине первыми реагируют на изменение скорости лимфотока (напряжение сдвига), растяжение стенки сосуда, действие химических веществ, приносимых с лимфой и другие воздействия [267, 269]. Стимуляция эндотелиоцитов приводит к выделению ими ряда биологически активных веществ, оказывающих регуляторный эффект на ГМК. Выделяемые эндотелием вещества разделяют на стимулирующие и ингибирующие сократительную активность ГМК [237]. Интактные эндотелиоциты синтезируют в основном вазодилататоры, к которым относят оксид азота (NO), простаглицлин (PGI₂) и эндотелиальный гиперполяризующий фактор (EDHF) [141, 197].

Активация синтеза NO происходит в результате усиления лимфотока, приводящего к возрастанию напряжения сдвига, или посредством стимуляции эндотелиоцитов различными гуморальными факторами, например ацетилхолином [141, 221, 272]. При увеличении синтеза NO происходит изменение электрической активности лимфатических сосудов – удлинение фазы спонтанной деполяризации, что приводит к уменьшению количества пиков потенциалов

действия и, как следствие, урежению частоты фазных сокращений [120, 197]. Механизм ингибирующего действия NO связан с активированием растворимой гуанилатциклазы и увеличением выхода K^+ из клетки, что приводит к гиперполяризации плазматической мембраны ГМК [23].

Вырабатываемый эндотелиоцитами эндотелиальный гиперполярирующий фактор вызывает снижение пропульсионной функции в изолированном грудном протоке собаки путем активации гуанилатциклазы с последующим повышением в цитозоле концентрации цГМФ [237].

Важную роль в вазодилатации играют простагландины (PG). Из этой группы наиболее мощным вазодилататорным действием обладает простациклин, механизм внутриклеточного пути сигнализации которого связан с протеином GS, который вызывает рост концентрации цАМФ в клетке, что приводит к повышению проницаемости АТФ-зависимых Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов с последующим развитием гиперполяризации [160, 207]. Есть данные, что PGE2 и PGE1 ингибируют сократительную активность мезентериальных лимфатических сосудов быка, в настоящее время механизмы их действия выясняются [207].

К наиболее характерным вазоконстрикторам эндотелиальной природы относят эндотелин-1(ET) и PGF2 α [174, 239, 287]. Действие эндотелина-1 в концентрациях 10^{-10} и 10^{-9} М на ETA рецепторы на миоцитах оказывает дозозависимый положительный хронотропный эффект в изолированных кольцах брыжеечных ЛС быка; активация эндотелином-1 ETB рецепторов, которые в основном расположены на эндотелиальных клетках, приводит к увеличению выделения оксида азота и ингибированию сократительной активности ЛС [239].

Внутриклеточный путь сигнализации ETA рецепторов через G-белки связан с фосфолипазой C, выходом Ca^{2+} из внутриклеточных IP3-зависимых депо и, в меньшей степени, поступлением Ca^{2+} через потенциалзависимые каналы L-типа. В более высоких концентрациях эндотелин-1 (выше 10 нМ) вызывает

спастическую констрикцию сосудов, причиной которой является избыток цитозольного Ca^{2+} [150, 287].

Арахидоновая кислота, как источник синтеза эйкозаноидов (простагландинов и лейкотриенов), также влияет на моторику ЛС [173, 174]. Арахидоновая кислота в концентрациях 10^{-8} – 10^{-6} М вызывает констрикцию в изолированных пренодальных подвздошных ЛС крысы в условиях перфузии под давлением 6 см H_2O – наблюдается уменьшение диаметра сосуда. Изолированные ЛС печени свиньи реагируют на действие простагландина PGF_2 (TXA_2) дозозависимой констрикцией [148]. TXA_2 в низких концентрациях повышает фазную активность и тонус в изолированном перфузируемом грудном протоке собаки.

1.5.3. Влияние вегетативной нервной системы на сократительную активность лимфатических сосудов

Вегетативная нервная система оказывает влияние на моторику ЛС, эффект зависит от типа иннервирующего отдела и плотности иннервации, которая определяется региональной принадлежностью сосуда [192, 193]. Крупные ЛС конечностей иннервируются в основном симпатическим отделом нервной системы, в то же время грудной проток и брыжеечные ЛС имеют двойную иннервацию – симпатическую и парасимпатическую (блуждающий нерв) [12, 211]. Известно, что иннервация ЛС более плотная в области перехода лимфатических сосудов малого диаметра в более крупные [13, 18]. Неравномерно иннервирован и сам лимфангион: в стенке лимфангиона адренергические нервные волокна в наибольшем количестве присутствует в манжетке, а наименьшую плотность иннервации имеет клапанный синус, что, по мнению морфологов, связано с отсутствием управляемых структур – миоцитов [56].

Реакция на трансмуральную стимуляцию изолированных мезентериальных ЛС быка отличалась в зависимости от локализации электрода в лимфангионе:

действие стимулятора на манжетку лимфангиона вызывает усиление фазной активности путем влияния норадреналина на постсинаптические α -адренорецепторы, а трансмуральная стимуляция в области клапана вызывает ингибирование сократительной активности лимфангионов путем активации постсинаптических β -адренорецепторов [192, 193].

Несмотря на то, что морфологи выявили холинергическую иннервацию ЛС, по-видимому, в них, так же, как и в кровеносных сосудах, влияние автономной нервной системы в основном определяется симпатическим отделом [124]. Исследование иннервации грудного протока собаки показало, что рецепторы к ацетилхолину в стенке сосуда присутствуют, но нервные волокна не обнаружены [191]. Схожие результаты получены в изолированных мезентериальных ЛС быка [193, 249].

В субэндотелиальном слое стенки мезентериальных ЛС быка были обнаружены многочисленные немиелинизированные нервные волокна, которые находятся в тесном контакте с эндотелиальными клетками. Применение моноклональных антител позволило определить, что эти волокна выделяют такие нейротрансмиттеры, как субстанция Р и кальцитонин-ген-связанный пептид. Было высказано предположение, что эти волокна осуществляют механорецепцию: они реагируют на величину эндолимфатического давления, и при его изменениях, локально выделяют субстанцию Р и кальцитонин-связанный пептид, которые могут вызвать вазоконстрикцию [249].

1.5.4. Метаболическая регуляция и регуляция с участием биологически активных веществ

ЛС и ЛУ чувствительны к действию большого количества гуморальных факторов, которые влияют как непосредственно на ГМК так и через эндотелиоциты [213, 251]. Установлена высокая реактивность ЛС к изменению содержания кислорода и рН: ацидоз и снижение напряжения кислорода в

интерстициальном пространстве ингибируют сократительную активность грудного протока крысы [44].

Норадреналин действует на ЛС быка двухфазно: в низких концентрациях (менее 10^{-6} М) наблюдается усиление сократительной активности связанное с активацией α -адренорецепторов, в более высоких концентрациях он ингибирует сократительную активность лимфангионов посредством стимуляции β_1 и β_2 -адренорецепторов [55, 104].

Адреналин увеличивает объем перфузата, вытекающего из изолированного грудного протока собаки [251], но не вызывает усиления лимфотока в грудном протоке овцы при внутривенном введении [55]. Изолированные ЛС печени свиньи реагируют на действие адреналина и норадреналина дозозависимой констрикцией [148]. Адреналин в низких концентрациях (10^{-9} – 10^{-8} М) вызывает усиление фазных сокращений в изолированных кольцах грудного протока человека в изометрических условиях, а в более высоких – приводит к повышению тонуса [155].

Холинэргические влияния на моторику изолированных препаратов грудного протока собаки и мезентериальных ЛС быка представляются не однозначными и зависят от концентрации ацетилхолина. Ацетилхолин в концентрациях 3×10^{-7} – 10^{-4} М вызывает увеличение частоты фазных сокращений обоих объектов, а в более низких концентрациях ингибирует сократительную активность [55]. Ацетилхолин в концентрациях 3×10^{-8} – 10^{-5} М в изолированных брыжеечных ЛС быка вызывает отрицательный хронотропный и инотропный эффект, который проявляется только в присутствии эндотелиоцитов. В деэндотелизированных ЛС ацетилхолин в том же диапазоне концентраций не оказывал существенного влияния на спонтанные сокращения [279].

Раскрыты механизмы действия ацетилхолина на афферентные лимфатические сосуды подвздошных ЛУ крысы в условиях перфузии. В концентрации от 10^{-7} до 10^{-5} М ацетилхолин ингибировал сократительную активность, что связано с увеличением синтеза эндотелиоцитами NO и

простагландинов [197]. В другой работе автор связывает ингибирование сократительной активности ЛС под действием ацетилхолина с усилением синтеза эндотелиоцитами эндотелиального гиперполяризующего фактора [214].

Гепарин, как один из местных регуляторных факторов, выделяемых лаброцитами, неоднозначно действует на лимфатические сосуды: в концентрациях до 5 Ед/мл он стимулирует сократительную активность изолированных ЛС быка и крысы, а в концентрации 10-50 Ед/мл снижает параметры сократительной активности лимфангионов: наблюдается уменьшение амплитуды и частоты фазных сокращений на фоне снижения тонуса [41, 55]. Механизм стимулирующего влияния гепарина исследователи связывают с усилением выделения эндотелием такого вазоконстриктора, как эндотелин-1, который активирует ET_A рецепторы на миоцитах [125]. На культуре эндотелиальных клеток быка показало, что влияние гепарина в высоких концентрациях осуществляется посредством усиления выделения эндотелиоцитами NO и, в меньшей степени, простаглицина [152].

Под влиянием АТФ в изолированном грудном протоке собаки в изометрических условиях наблюдалось дозозависимое расслабление [251]. Изолированные мезентериальные ЛС морской свинки реагировали на действие АТФ в концентрациях 10^{-8} – 10^{-3} М учащением ритма спонтанных сокращений [133]. Действие АТФ на P2X и Y пуриновые рецепторы вызывало повышение активности фосфолипазы A2, что приводило к увеличению концентрации ТХА2, обладающего вазоконстрикторным действием [286].

1.6. Иммуномодуляторы. Функции иммуномодуляторов

В организме человека иммунокомпетентные клетки вырабатывают специальные регуляторные вещества – цитокины. Цитокины - это белково-пептидные информационные молекулы, осуществляющие межклеточное взаимодействие всех звеньев иммунной системы, а также межсистемные

взаимодействия. Они определяют выживаемость клеток, стимуляцию или ингибирование роста, дифференцировку, функциональную активацию и апоптоз [5, 37, 60, 61, 255]. Эти функции осуществляются за счет их взаимодействия с рецепторами на поверхности клеток, при этом происходит передача сигнала в ядро через элементы внутриклеточной трансдукции по пути JAK-STAT или Ras-MAP и последующая активация соответствующих генов [78]. Цитокины выполняют следующие функции: регуляция воспалительных процессов, гемопоэза; регуляция эмбриогенеза; регуляция процессов регенерации для восстановления поврежденных тканей, а также, участие в ангиогенезе, апоптозе и хемотаксисе [35, 51, 68]. Важнейшей функцией цитокинов является регуляция реакций врожденного и приобретенного иммунитета.

На основе природных иммуномодуляторов в настоящее время разработаны официальные препараты, используемые в лечении различных заболеваний. Различают три основных группы иммуотропных лекарственных препаратов: иммуномодуляторы, иммуностимуляторы и иммунодепрессанты [52]. Иммуномодуляторы – это препараты, восстанавливающие в терапевтических дозах функции иммунной системы (эффективную иммунную защиту). Следовательно, иммунологический эффект иммуномодуляторов зависит от исходного состояния иммунитета больного: эти лекарственные средства понижают повышенные и повышают пониженные показатели иммунитета [40].

Ниже представлено описание нескольких иммуномодуляторов, эффекты которых на лимфатическую систему были изучены в настоящей работе.

1.6.1. Интерфероны

Интерфероны - препараты, обладающие выраженными иммуномодулирующими свойствами [27]. Понятие «интерферон» объединяет семейство близкородственных белков, в ряде случаев гликопротеинов, с молекулярным весом от 18 до 25 килодальтон, характеризующихся антивирусной активностью и являющихся посредниками в межклеточных взаимоотношениях.

Путем воздействия на соответствующие клеточные рецепторы интерфероны способны формировать новый, интерферон-индуцированный фенотип клетки [222].

Интерфероны, как составная часть общей цитокиновой сети организма, являются иммунорегуляторными молекулами, оказывающими действие на все клетки иммунной системы. В организме человека интерфероны вырабатываются и аккумулируются во всех ядросодержащих клетках крови и эпителиальных клетках слизистых оболочек. Известно, что интерфероны синтезируются на первых этапах иммунного ответа и являются мощными активаторами НК-клеток, являющихся в свою очередь главным источником продукции интерферона γ , задолго до начала его синтеза Т-лимфоцитами. В зависимости от клеток-продуцентов интерферонов, а также от используемых индукторов, они подразделяются в настоящее время на два типа: α , β и γ -интерфероны.

Интерфероны- α , по старой номенклатуре классические интерфероны I типа, согласно современным представлениям, синтезируются в клетках млекопитающих только в ответ на классические индукторы: вирусы, двуспиральные РНК [129]. Что касается клеток-продуцентов, то здесь не существует жестких разграничений: так интерферон- α продуцируется, как правило, лейкоцитами периферической крови, селезенки или других лимфоидных органов в ответ на классический индуктор, а интерферон- β или фибробластный, продуцируется преимущественно фибробластами или фибробластоподобными клетками, однако, с помощью иммунохимического и хроматографического анализа было показано, что и лимфоидные клетки могут продуцировать интерферон- β , а фибробласты могут продуцировать интерферон- α [175].

Второй тип интерферонов – γ -интерферон или иммунный, продуцируется Т-лимфоцитами в ответ на их стимуляцию митогенами, бактериальными и вирусными антигенами, аллогенными клетками и антисыворотками против поверхностных антигенов, или комплексами антиген-антитело [137].

Существует предположение, что основной функцией IFN является распознавание, деградация и элиминация чужеродной информации (главным образом – вирусных нуклеиновых кислот) [33]. IFN обладают уникальным спектром биологической активности и являются наиболее изученными медиаторами врожденного иммунитета.

1.6.2. Механизм действия интерферонов

Доказано, что действие IFN реализуется посредством разнообразных механизмов. Отметим основные из них:

- изменение поверхности клеточных мембран и блокада прикрепления и внедрения вируса в клетки;
- подавление репликации вирусных нуклеиновых кислот;
- стимуляция презентации антигенов;
- повышение неспецифической активности натуральных киллеров (NK-клетки);
- стимуляция дифференцировки В-клеток;
- стимуляция Т-клеточного ответа;
- подавление аллергических реакций;
- стимуляция синтеза окиси азота посредством активации iNOS;
- развитие гиперчувствительности замедленного типа и активация высвобождения медиаторов воспаления;
- активация факторов апоптоза.

Перечисленные эффекты определяют медицинскую значимость препаратов IFN [28, 29, 30, 31, 39, 90, 252].

1.6.3. Функции интерферонов и их медицинская значимость

Основной точкой приложения IFN являются вирусные мРНК, трансляция которых блокируется индуцированными IFN ферментами –

олигоаденилатсинтетазы, протеинкиназы, латентными эндонуклеазами. В результате происходит приостановка трансляции вирусных белков и подавление репродукции вирусов. Данный механизм универсален и реализуется при многих вирусных инфекциях, чем объясняется широкий спектр клинического применения IFN [30, 241].

Помимо противовирусного действия интерфероны обладают противоопухолевой защитой, они задерживают пролиферацию опухолевых клеток, а также иммуномодулирующей активностью, стимулируя фагоцитоз, естественные киллеры, регулируя антителообразование В-клетками, активируя экспрессию главного комплекса гистосовместимости.

Современный фармацевтический рынок представлен десятками созданных к настоящему времени лекарственных форм IFN. В клинической практике используется два основных типа IFN человека: 1 тип – IFN- α и β и 2 тип – IFN- γ .

В клинической практике препараты рекомбинантного IFN- β нашли применение при широком спектре патологий. Это лечение, в первую очередь, рассеянного склероза, различных вирусных инфекций (вирусные гепатиты, герпесвирусные заболевания). Многие препараты интерферона и его индукторов с успехом применяются для терапии злокачественных новообразований и наиболее эффективны при злокачественных заболеваниях кроветворной и лимфоидной тканей, кожных опухолей различных локализаций и этиологии [1, 28, 261].

1.7. Интерлейкины. Классификация интерлейкинов

Интерлейкины являются продуктами иммунокомпетентных клеток и в то же время иммунокомпетентные клетки служат для них мишенями. Провоспалительные цитокины, продуцируются, секретируются и действуют через свои рецепторы на иммунокомпетентные клетки на ранней стадии воспалительного ответа, участвуют в запуске специфического иммунного ответа и в эффекторной его фазе. В эту группу включают: IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF α ,

IFN α , IFN γ , MIF. Провоспалительные цитокины обеспечивают рекрутирование в очаг воспаления эффекторных клеток, стимулируют их фагоцитарную, бактерицидную активность [77], оказывают влияние практически на все органы и системы организма, участвующие в регуляции гомеостаза [50, 72]. Альтернативную группу представляют противовоспалительные цитокины: IL-4, IL-10, IL-13 и TGF β .

В регуляции специфического иммунного ответа участвуют многие цитокины: IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IFN γ , TGF β . Также многие цитокины активно участвуют в регуляции миеломоноцитопоэза и лимфопоэза: G-CSF, M-CSF, GM-CSF, IL-3, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, TGF β [91].

Остановимся подробнее на провоспалительных цитокинах IL-1 и IL-2. Под названием интерлейкин-1 (IL-1) объединены два полипептида: IL-1 α и IL-1 β , обладающие широким спектром провоспалительной, метаболической, физиологической, гемопоэтической и иммунологической активности. Несмотря на то, что две формы IL-1 являются продуктами разных генов, они взаимодействуют с общим рецептором и имеют сходные биологические свойства. Как правило, клетки организма не способны к спонтанному синтезу IL-1, а отвечают его продукцией на: инфекцию, действие микробных токсинов, воспалительных агентов, других цитокинов, активированных компонентов комплемента или системы свертывания крови. Список клеток-продуцентов IL-1 включает не только гемопоэтические клетки, но и эпителиальные, нервные и др. Столь же широк спектр клеток-мишеней этого цитокина. Вместе с TNF α и IL-6 IL-1 входит в группу провоспалительных цитокинов с перекрывающимися биологическими свойствами: способностью стимулировать Т- и В-лимфоциты, усиливать клеточную пролиферацию, инициировать или супрессировать экспрессию определенных генов. В качестве медиатора воспаления IL-1 способен опосредовать развитие системного острофазного ответа. С повышенным уровнем этого цитокина в крови сопряжены лихорадка, анорексия, нейтрофилия,

активация эндотелиальных клеток с повышением экспрессии на них адгезионных молекул, активация нейтрофилов, повышенный синтез острофазных белков и компонентов комплемента, синтез коллагенов и коллагеназ, активация остеобластов. IL-1 известен своей способностью активировать синтез других цитокинов. Кроме того, IL-1 может индуцировать собственный синтез и экспрессию рецепторов для IL-2 [38].

На клетках продуцентах интерлейкинов и их биологических эффектах в моделях на мышах следует остановиться подробнее. Биологические свойства IL-1 α и β очень сходны, либо идентичны. IL-1 α активирует преимущественно Т-лимфоциты, обладает аутокринным и паракринным действием, в то время как IL-1 β – многофункциональный цитокин с широким спектром действия, играет ключевую роль в развитии и регуляции неспецифической защиты и специфического иммунитета, один из первых включается в ответную защитную реакцию организма при действии патогенных факторов. Основными продуцентами IL-1 β являются макрофаги и моноциты. Клетки-мишени: иммунокомпетентные, эндотелиальные, эпителиальные клетки, фибробласты и др. IL-1 β инициирует и регулирует воспалительные, иммунные процессы, активирует нейтрофилы, Т- и В-лимфоциты, стимулирует синтез белков острой фазы, ЦК (IL-2, -3, -6, TNF- α), молекул адгезии (Е-селектинов), прокоагулянтов, простагландинов. IL-1 β повышает хемотаксис, фагоцитоз, гемопоэз, проницаемость сосудистой стенки, цитотоксическую и бактерицидную активность, оказывает пирогенный эффект и др. IL-1 активирует гипоталамический центр терморегуляции, являясь эндогенным пирогеном.

Известны факторы, снижающие биологическую активность IL-1. К ним прежде всего относят глюкокортикоиды и простагландины. Известно, что IL-1 β способен преодолевать гематоэнцефалический барьер и проникает в мозг, где в паравентрикулярном ядре гипоталамуса стимулирует секрецию кортикотропин-рилизинг фактора, который в свою очередь повышает продукцию гипофизом

адренкортикотропного гормона (АКТГ). АКТГ инициирует выброс из клеток коры надпочечников в кровь глюкокортикоидных гормонов.

Эндотелиальные клетки сосудов человека под влиянием $IL-1\alpha$ и β секретируют полипептиды, подобные тромбоцитарному фактору роста. Эти полипептиды могут стимулировать клеточную миграцию и пролиферацию и вызывать освобождение сосудистых медиаторов воспаления. При воспалении проницаемость стенок кровеносных и лимфатических сосудов повышается под действием $IL-1\alpha$, TNF и интерферона γ (IFNG). Рецептор $IL-1$ первого типа ($IL-1R1$) экспрессируется на многих клетках: Т-лимфоцитах, тимоцитах, фибробластах, эндотелиальных клетках, гепатоцитах и др. Тип 2 рецепторов ($IL-1R2$) характерен для В-клеток, макрофагов и моноцитов. Эти два рецептора имеют различные характеристики связывания с $IL-1\alpha$ и β .

Интерлейкин-2 ($IL-2$) играет исключительно важную роль в реализации механизмов иммунного ответа. Продуцентами $IL-2$ являются Т-хелперы 1 типа. Помимо участия $IL-2$ в дифференцировке и пролиферации Т-клеток, $IL-2$ принимает непосредственное участие в реализации механизмов противоопухолевой защиты. $IL-2$ повышает литическую активность НК-клеток, а также индуцирует клетки системы ЛАК (лимфокин-активированные киллеры). Кроме того, он усиливает секрецию $IFN\gamma$ Т-лимфоцитами. Рекомбинантный человеческий $IL-2$ может активировать В-клетки, индуцируя как их пролиферацию, так и дифференцировку в иммуноглобулин-синтезирующие клетки, происходит стимуляция секреции антител [172, 224]. Размножение Т-клеток регулируется $IL-2$. Вследствие индукции $IL-2$ -рецепторов, иммунологически нормальные клетки пролиферируют и это продолжается до снижения уровня $IL-2$ [122, 166, 172, 265].

1.7.1. Механизмы действия интерлейкинов

Действие цитокинов на клетку-мишень опосредуется высокоспецифичными высокоаффинными мембранными рецепторами. Все рецепторы цитокинов представляют собой трансмембранные гликопротеины, у которых внеклеточная часть отвечает за связывание цитокина. Растворимый рецептор, связывающийся с цитокином, – это отщепленный ферментом внеклеточный домен мембранного рецептора. В результате взаимодействия цитокина с рецептором инициируется сигнал, передача которого в клетку обычно происходит либо по пути с участием янус-киназы (JAK)-STAT, либо по пути с участием киназы Ras-MAP [76].

Внутриклеточная передача сигнала при действии цитокинов осуществляется следующим образом. В состав С-концевой цитоплазматической части некоторых цитокиновых рецепторов входит домен, обладающий активностью тирозинкиназы. При взаимодействии цитокина с рецептором происходит генерация сигнала, приводящего к формированию транскрипционных факторов и активации генов, определяющих реакцию клетки на действие цитокина. Одновременно происходит поглощение клеткой комплекса цитокина с рецептором и расщепление его в эндосомах. Сама по себе интернализация этого комплекса к передаче сигнала отношения не имеет. Она необходима для утилизации цитокина, предотвращающей его накопление в месте активации клеток-продуцентов. Индукция сигнала начинается с аутокаталитического фосфорилирования связанных с рецептором Jak-киназ, запускаемого конформационными изменениями рецептора, которые происходят в результате его взаимодействия с цитокином. Активированные Jak-киназы фосфорилируют цитоплазматические факторы STAT (Signal transducers and activators of transcription), присутствующие в цитоплазме в неактивной мономерной форме. Фосфорилированные мономеры приобретают сродство друг к другу и димеризуются. Димеры STAT перемещаются в ядро и выступают в качестве транскрипционных факторов, связываясь с промоторными участками генов-

мишеней. При действии провоспалительных цитокинов активируются гены молекул адгезии, самих цитокинов, ферментов окислительного метаболизма и др. [76].

1.7.2. Функции интерлейкинов и применение во врачебной практике

В клинической практике иммунокоррекции используется ряд лекарственных препаратов на основе естественных иммунорегуляторных молекул, среди которых широкое применение нашли препараты на основе интерлейкинов (IL-1, IL-2, IL-18 и др.). Например, препарат на основе IL-1 β (Беталейкин®) усиливает лейкопоз, восстанавливает костномозговое кроветворение, активирует нейтрофилы, усиливает дифференцировку предшественников иммунокомпетентных клеток, пролиферацию лимфоцитов, синтез цитокинов и антител. Данный препарат применяется при токсической лейкопении, возникающей при химио- и радиотерапии злокачественных опухолей, и в качестве протектора лейкопоза при необходимости проведения химиотерапии на фоне лейкопении. Основным показателем к использованию препарата являются вторичные иммунодефицитные состояния различного генеза [67]. Препарат на основе IL-2 (Ронколейкин®) усиливает рост, дифференцировку и активацию Т- и В-лимфоцитов, моноцитов, макрофагов и вспомогательных клеток, активирует естественные киллеры и цитотоксические Т-лимфоциты. Ронколейкин применяют в комплексной терапии для лечения септических состояний различной этиологии, сопровождающихся иммуносупрессией [62], а также для лечения рака почки.

1.8. Глюкокортикоиды. Эффекты глюкокортикоидных гормонов на иммунную систему, возникающие при физиологической концентрации гормонов в организме

В физиологических условиях, когда организм человека или животного испытывает стресс, повышается уровень циркулирующих глюкокортикоидных гормонов (ГК), эффекты которых проявляются в снижении количества Т- и В-лимфоцитов в периферической крови, подавлении первичного и вторичного иммунного ответа на различные антигены, снижении активности естественных киллеров и макрофагов, подавлении способности клеток продуцировать интерфероны и т.д. [161, 242]. В норме активация гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси приводит к контролируемому ингибированию иммунных и воспалительных реакций и предупреждает гиперактивацию воспаления, перепроизводство цитокинов и иммунное повреждение тканей [167]. Эта физиологическая петля обратной связи служит главным регуляторным механизмом контроля и сдерживания врожденного/приобретенного иммунитета и воспалительных реакций. Кортизол модулирует концентрацию нескольких провоспалительных цитокинов, включая IL-2, IL-3, IL-6, TNF- α и интерферон- γ [109]. Известно, что при воспалении концентрация ГК в плазме крови и тканях возрастает в несколько раз [262]. Экспериментально показано, что ГК селективно подавляют продукцию цитокинов Тх-1 профиля, в частности интерферона- γ [132]. В целом эффект ГК является результатом подавления разных этапов иммуногенеза: миграции стволовых и В-клеток, взаимодействия Т- и В-лимфоцитов, торможения высвобождения цитокинов из лимфоцитов и макрофагов и других реакций иммунной системы [53].

1.8.1. Механизм действия глюкокортикоидов

После прохождения через мембрану клетки ГК в цитоплазме связываются со специфическим стероидным рецептором. В покое глюкокортикоидные рецепторы связаны с белком теплового шока (hsp90) в неактивный комплекс. Под влиянием ГК рецептор освобождается от белка, присоединяет гормон, после чего комплексы гормон-рецептор объединяются попарно и полученные пары

поступают в ядро клетки, где связываются с рецепторными последовательностями нуклеотидов на поверхности ДНК. Активация рецепторов ДНК приводит к изменению процессов транскрипции ряда генов и стимулированию образования информационной РНК. В результате трансляции РНК на рибосомах синтезируются различные регуляторные белки. Одним из важнейших является липокортин, который ингибирует фермент фосфолипазу- A_2 и, тем самым, подавляет синтез простагландинов и лейкотриенов, играющих ключевую роль в развитии воспалительной реакции.

Имеются работы, в которых раскрыты молекулярные механизмы действия ГК на иммунную систему [115]. Показано, что ГК, будучи липофильными, проникают путём диффузии через цитоплазматические мембраны и связываются с находящимися в цитозоле глюкокортикоидными рецепторами. Данные рецепторы повсеместно экспрессируются ядродержащими клетками организма. Подобно другим ядерным рецепторам (действующим в пределах клеточного ядра), рецептор ГК состоит из трёх доменов: первый, N-концевой домен, взаимодействует с корегуляторами и компонентами транскрипционного аппарата; второй, ДНК-связывающий домен, содержит два мотива «цинковых пальцев» для геномных взаимодействий; третий, лиганд-связывающий домен, напоминает гидрофобный карман и служит, собственно, для связывания лиганда [181].

Рецепторы глюкокортикоидных гормонов человека кодируются геном NR3C1. Белки, синтезируемые на мРНК-копии гена NR3C1, неоднородны. Классическим рецептором, ассоциированным с транскрипционной регуляцией ГК, является GR α . GR β , в противоположность GR α , представляет собой вариант сплайсинга, который не связывает лиганды, однако, как считается, является доминантным ингибитором GR α . Кроме того, есть упоминания и о прямой транскрипционной активности GR β [210]. Различия в экспрессии изоформ рецепторов ГК могут в какой-то степени объяснить клеточно-специфический ответ на глюкокортикоиды. В отсутствие лиганда GR α локализованы в цитоплазме в виде мультипротеинового комплекса с белками теплового шока,

иммунофиллинами и другими шаперонами, которые усиливают сродство рецептора к лиганду и предотвращают деградацию рецептора. По классическому пути связывание с лигандом индуцирует конформационное изменение рецептора, вследствие чего комплекс с шаперонами распадается, что в итоге делает возможным транспорт рецептора в ядро. В ядре рецепторы ГК взаимодействуют с ДНК и другими белками, опосредуя развитие биологического ответа. Отсоединение лиганда ведёт к кальретикулин-опосредованному экспорту рецептора из ядра обратно в цитоплазму, где он снова переходит в комплексную форму, объединяясь с шаперонами и приобретая способность снова связаться с лигандом для запуска следующего цикла [98].

Геномные эффекты ГК проявляются обычно не ранее, чем, через 6 часов, в то же время выявлены негеномные эффекты ГК, которые проявляются в пределах от нескольких секунд до минут. Интеркаляция (встраивание) ГК в мембраны подразумевает под собой независимый от глюкокортикоидных рецепторов механизм для изменения катионного транспорта через цитоплазматические мембраны и для поддержания утечки протонов из митохондрий [96].

В лимфоидной ткани избыток ГК приводит к угнетению синтеза антител и уменьшению образования лимфоцитов, поэтому при стрессе (когда вырабатывается много ГК) снижается иммунная защита организма и повышается восприимчивость к инфекционным заболеваниям. Указанный механизм действия ГК на лимфоидную ткань лежит в основе их применения при лечении аллергии и при трансплантации для подавления реакции отторжения пересаженного органа.

1.8.2. Фармакологические эффекты глюкокортикоидов

Фармакологические эффекты возникают только при сверхфизиологических концентрациях гормона в организме.

Противовоспалительный эффект. Механизм противовоспалительного действия ГК обусловлен несколькими факторами: ГК подавляют активность

фосфолипазы A_2 , что сопровождается снижением образования арахидоновой кислоты. При нарушении образования арахидоновой кислоты выключается ее дальнейший метаболизм как по циклооксигеназному пути - с выключением синтеза простагландинов, так и по липоксигеназному пути - с выключением синтеза лейкотриенов. Этот эффект развивается наиболее быстро, при этом преимущественно подавляется развитие внешних признаков воспалительной реакции (боль, повышение температуры, отек и покраснение тканей в области воспаления). Противовоспалительное действие ГК усиливается их способностью тормозить экспрессию гена циклооксигеназы 2-го типа, что также приводит к снижению синтеза простагландинов в очаге воспаления, в том числе провоспалительных простагландинов E_2 и I_2 .

ГК тормозят экспрессию молекул межклеточной адгезии в эндотелии кровеносных сосудов, что нарушает проникновение нейтрофилов и моноцитов в очаг воспаления. После введения ГК повышается концентрация нейтрофилов в крови (за счет их поступления из костного мозга и за счет ограничения миграции из кровеносных сосудов), что приводит к снижению количества этих клеток в месте воспаления. Количество циркулирующих в крови лимфоцитов (Т- и В-клеток), моноцитов, эозинофилов и базофилов снижается за счет их перемещения из сосудистого русла в лимфоидную ткань. При этом подавляются функции лейкоцитов, и особенно тканевых макрофагов, что ограничивает их способность реагировать на антигены, митогены, микроорганизмы и вырабатывать кинины и пирогенные факторы. Эти изменения проявляются в максимальной степени через 6 ч и исчезают через 24—36 ч.

ГК тормозят транскрипцию генов провоспалительных цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8, фактора некроза опухоли и др.), тормозят транскрипцию и усиливают деградацию генов рецепторов к ИЛ-1 и ИЛ-2, тормозят транскрипцию генов металлопротеиназ (коллагеназы, эластазы и др.), участвующих в повышении проницаемости сосудистой стенки, а также в процессах рубцевания и деструкции хрящевой ткани при заболеваниях суставов.

Механизмы иммуносупрессивного действия ГК основаны на метаболических эффектах (торможение синтеза белков, в том числе антител) и на уже описанных выше эффектах. ГК оказывают противошоковое действие. Механизм противошокового действия ГК связан с уменьшением синтеза фактора активации тромбоцитов - ФАТ, а также с уменьшением захвата и повышением прессорного действия катехоламинов (повышают чувствительность адренорецепторов к катехоламинам).

Иммуносупрессивный эффект. ГК оказывают многостороннее угнетающее действие на иммунную систему, связанное с подавлением ряда цитокинов: торможение генов синтеза: IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, что приводит к тому, что не активируются Т-хелперы, Т-хелперы не передают сигнал на рабочие лимфоциты, не созревают В-лимфоциты в плазматические клетки для синтеза антител, не происходит созревания Т-лимфоцитов и НК-клеток, ослабляется эффект IL-2. Развивается апоптоз В-лимфоцитов: угнетение гуморального иммунитета (нарушение синтеза антител), снижение сопротивляемости к бактериальным инфекциям. Апоптоз Т-лимфоцитов, макрофагов и натуральных киллеров приводит к угнетению клеточного иммунитета, противовирусного иммунитета, аллергических реакций замедленного типа, реакции отторжения трансплантата. Подавляется продукция антигенов в поврежденных тканях, тормозится синтез и увеличивается распад компонентов системы комплимента:

Влияние на сердечно-сосудистую систему. ГК повышают артериальное давление и стабилизируют его на этом повышенном уровне. Эффект связывают с одной стороны с увеличением ОЦК на фоне задержки жидкости из-за минералокортикоидной активности ГК, с другой стороны – с повышением чувствительности миокарда и сосудов к катехоламинам.

Влияние на кроветворение. ГК тормозят синтез гемопоэтических факторов и гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF), которые необходимы для процесса деления стволовых клеток костного мозга. Поэтому на фоне введения ГК в крови снижается уровень лимфоцитов,

моноцитов, базофилов, эозинофилов. В то же время образование нейтрофилов в костном мозге и их концентрация в крови возрастает. После однократного введения ГК этот эффект достигает максимального значения к 6-му часу и уменьшается к концу суток.

1.8.3. Применение глюкокортикоидов

Различают три вида глюкокортикоидной терапии. Замещающая терапия проводится при хронической надпочечниковой недостаточности и острой надпочечниковой недостаточности, например при шоке. Как правило для возмещающей терапии рекомендуется применять ГК с минералокортикоидной активностью.

Супрессорная терапия применяется: 1) при адреногенитальном синдроме. При этом состоянии имеется врожденный дефект фермента 21β -гидроксилазы, который обеспечивает последние этапы синтеза ГК. Назначение небольших доз ГК у таких пациентов приводит к тому, что по механизму обратной связи выделение АКТГ подавляется и избыточная продукция андрогенов надпочечниками прекращается; 2) для подавления реакции отторжения трансплантата у пациентов с пересаженными органами. ГК подавляют реакции клеточного иммунитета, которые вызваны антигенами чужеродного органа; 3) ГК входят практически во все современные схемы химиотерапии злокачественных опухолей крови, рака молочной железы.

Фармакодинамическая (патогенетическая) терапия в форме интенсивной глюкокортикоидной терапии. Глюкокортикоиды вводят в высоких дозах (5 мг/кг в сутки по преднизолону) как правило, внутримышечно или внутривенно. Данный вид терапии применяют при: анафилактическом шоке (стероиды обрывают аллергическую реакцию и стабилизируют АД); травматическом шоке (стероиды стабилизируют АД); астматическом статусе (состоянии, при котором приступы астмы следуют друг за другом без периодов улучшения).

Лимитирующая (долговременная) терапия. Проводится в течение нескольких месяцев, лет или даже пожизненно. Данная терапия ставит перед собой целью подавить хронический воспалительный или аутоиммунный процесс. Ее применяют при: болезнях соединительной ткани (системная красная волчанка, ревматоидный артрит, системная склеродермия, дерматомиозит, узелковый периартериит и др.); болезнях ЖКТ (неспецифический язвенный колит, болезнь Крона, гепатиты); болезнях дыхательных путей (бронхиальная астма тяжелого течения); болезнях почек (хронический гломерулонефрит, нефротический синдром); болезнях крови (тромбоцитопеническая пурпура или болезнь Верльгофа) и др.

ГЛАВА 2

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Выбор объекта исследования

Для исследования использовали брыжеечные афферентные ЛС диаметром 1,2-1,5 мм и ЛУ быков черно-пестрой породы в возрасте 16-18 месяцев из ЗАО «Племенной завод ПРИНЕВСКОЕ». Сосуды и узлы вырезали через 12-15 минут после обескровливания животных и доставляли в лабораторию в физиологическом солевом растворе при температуре +2 - +4°C. Из 56 ЛС было приготовлено 192 сегмента, из 42 ЛУ было приготовлено 198 полосок капсулы. Основанием для выбора данного объекта исследования послужило то, что брыжеечные ЛС быка относятся к сосудам мышечного типа, для которых моторная или насосная функция преобладает над емкостной. Кроме того, к настоящему времени параметры спонтанной активности этих ЛС хорошо изучены [54, 55, 212]. Одновременно с этим, имеются данные о раскрытии механизмов миогенной, эндотелий-зависимой, нервной и гуморальной регуляции сократительной функции гладкомышечных клеток ЛС данного типа [74, 273].

В качестве второго объекта исследования использовали сегменты средней части изолированного кишечного ствола и ЛУ белой крысы (36 ЛС и 43 ЛУ от 36 крыс) [55, 151]. Кишечный ствол белой крысы морфологи также относят к сосудам мышечного типа [10, 15], в которых моторная или насосная функция преобладает над емкостной [55, 281]. Наиболее высокое содержание миоцитов отмечено в средней части кишечного ствола [9]. В эксперименте использовали самцов крыс линии Wistar из биокolleкции «Коллекция лабораторных млекопитающих разной таксономической принадлежности» Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, поддержанной программой биоресурсных коллекций ФАНО России, 36 животных в возрасте 6 месяцев.

2.2. Моделирование перитонита

С целью раскрытия механизмов действия ГК потребовалось создание модели перитонита с развитием сепсиса у лабораторных животных. В настоящее время, все существующие модели по воспроизведению экспериментального перитонита можно подразделить на пять групп [21, 71, 164, 220]: 1) введение в брюшную полость инородных тел, 2) введение в брюшную полость агрессивных веществ [59], 3) введение в брюшную полость экспериментальных животных чистых монокультур микроорганизмов [230] или их смесей (взвесь золотистого стафилококка) [64, 75], 4) комбинированные модели, при которых кроме введения в брюшную полость патогенного объекта, создают те или иные деструктивные процессы [4, 70], 5) введение в брюшную полость экспериментальных животных содержимого толстой кишки или вскрытие просвета тонкой или толстой кишки [22]. В последнюю группу можно включить модели с созданием механических повреждений желудочно-кишечного тракта с нарушением целостности его просвета.

В наших исследованиях использовали модель сепсиса, вызванного лигированием и перфорацией слепой кишки, что имитирует сепсис абдоминального происхождения [195]. Эксперименты были проведены на 36 крысах линии Sprague-Dawley в возрасте 6 месяцев и весом 450-480 г в условиях общей анестезии (золетил, 50 мг/кг, внутривенно) [107]. Глубину наркоза контролировали по степени выраженности корнеального рефлекса. Температуру тела животного поддерживали на уровне 36,0-36,8°C. У 16 животных под наркозом за 7 дней до операции была проведена двусторонняя адреналэктомия. Этим животным на протяжении всего исследования проводили заместительную терапию (ежедневно осуществляли подкожные инъекции дезоксикортикостерона ацетата (масляный раствор, 0,17 мг / кг) [126]. За 1 час до лигирования-пункции слепой кишки 8 адреналэктомизированным крысам интраперитонеально вводили дексаметазон (2 мг/кг массы). У всех животных была проведена срединная

лапаротомия. С помощью тупых анатомических пинцетов выводили на поверхность слепую кишку. У животных контрольной группы через 5 минут кишку возвращали в брюшную полость и брюшную стенку послойно ушивали. У остальных крыс лигировали слепую кишку в 5 см от илеоцекального клапана шелковой нитью (3-0, SOFSILK). После этого в бессосудистой зоне купол слепой кишки прокалывали насквозь инъекционной иглой 21G и слегка массировали до появления на поверхности маленьких капель кишечного содержимого, тем самым обеспечивая дальнейшее постепенное развитие воспалительного процесса за счет медленного постоянного поступления кишечного содержимого в брюшную полость. Затем кишку возвращали в брюшную полость и послойно ушивали брюшную стенку. Каждому животному вводили 10 мл физиологического раствора для восстановления баланса жидкости.

Через 24 часа под наркозом у животных вскрывали брюшную полость и забирали для исследования несколько брыжеечных ЛУ и кишечный ствол. До исследования препараты хранили в физиологическом солевом растворе при температуре $+2 - +4^{\circ}\text{C}$.

Исследование проводилось с соблюдением необходимых этических норм и правил, принятых при проведении экспериментов на животных (European Community Council Directives 86/609/EEC). Данные исследования были одобрены этическим комитетом Института физиологии им. И.П. Павлова РАН.

2.3. Приготовление препаратов для исследования

Сосуды и узлы очищали от жира и окружающей рыхлой соединительной ткани. Из ЛС (диаметр 1,2-1,5 мм) в средней части лимфангиона вырезали кольца шириной 1 мм (Рисунок 2.1). У части препаратов ЛС механически удаляли эндотелий.

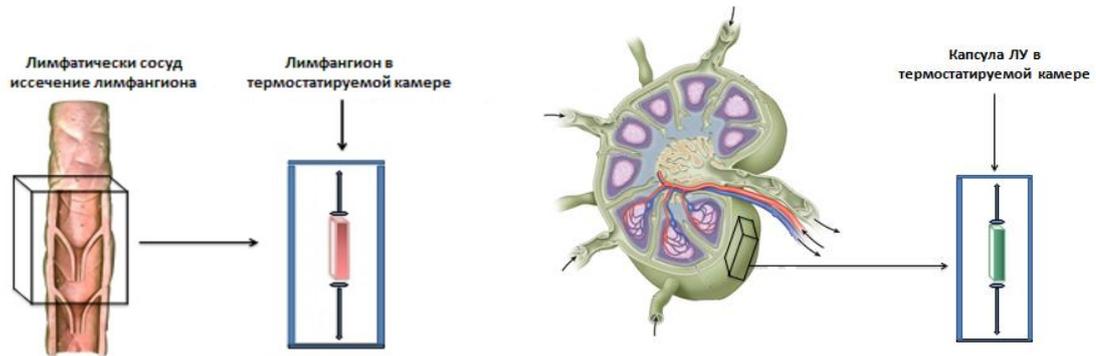


Рисунок 2.1 – Приготовление препаратов для исследования

В ЛУ вырезали полоски капсулы, ориентированные перпендикулярно к длинной оси узла, длина полосок составляла 10-15 мм, ширина 3 мм, толщина 500-600 мкм. Для изучения эндотелий-зависимых реакций у части препаратов корковое вещество узла и субкапсулярный синус тщательно удаляли. В итоге объект исследования представлял собой полоску капсулы узла без эндотелиальных клеток субкапсулярного синуса (Рисунок 2.1).

При изучении эффектов ГК в экспериментах на брыжеечных ЛС и брыжеечных ЛУ быков мы использовали методику инкубации препаратов в исследуемых растворах. Из 26 ЛС от 12 животных было приготовлено 78 сегментов, из 32 ЛУ от 11 животных были приготовлены 88 полосок капсулы. Сегменты ЛС и полоски капсулы ЛУ разделили на 7 групп. Первую группу препаратов (интактные сегменты ЛС (n=10), деэндотелизированные сегменты ЛС (n=10), интактные полоски капсулы ЛУ (n=12) и полоски с удаленным субкапсулярным синусом ((n=12) инкубировали 6 часов при +37°C в физиологическом солевом растворе, содержащем 1% бычьего сывороточного альбумина (Bovine Serum Albumin, Sigma-Aldrich), цефамандол (антибиотик широкого спектра действия) (АБОЛмед, Россия, 25 мкг/мл) и липополисахарид (ЛПС). Вторую группу (10 ЛС и 10 ЛУ) инкубировали в растворе такого же состава с добавлением дексаметазона, третью (10 ЛС и 12 ЛУ) – в растворе

такого же состава с добавлением 1400W (селективный ингибитор iNOS), четвертую (8 ЛС и 10 ЛУ) - в растворе такого же состава с добавлением династата (селективный ингибитор СОХ-2). Пятую группу препаратов (10 ЛС и 10 ЛУ) 3 часа инкубировали в растворе с ЛПС, содержащем дексаметазон, после этого в раствор вводили 1400W, шестую группу (10 ЛС и 10 ЛУ) также инкубировали 3 часа в растворе с ЛПС, содержащем дексаметазон, после этого в раствор вводили династат. В качестве контроля исследовали препараты, инкубированные в физиологическом растворе, содержащем 1% бычьего сывороточного альбумина и цефамандол (10 ЛС и 12 ЛУ).

По завершении инкубации препараты промывали физиологическим раствором и помещали в камеру миографа с датчиком силы FORT-10 (WPI, USA) (Рисунок 2.2).

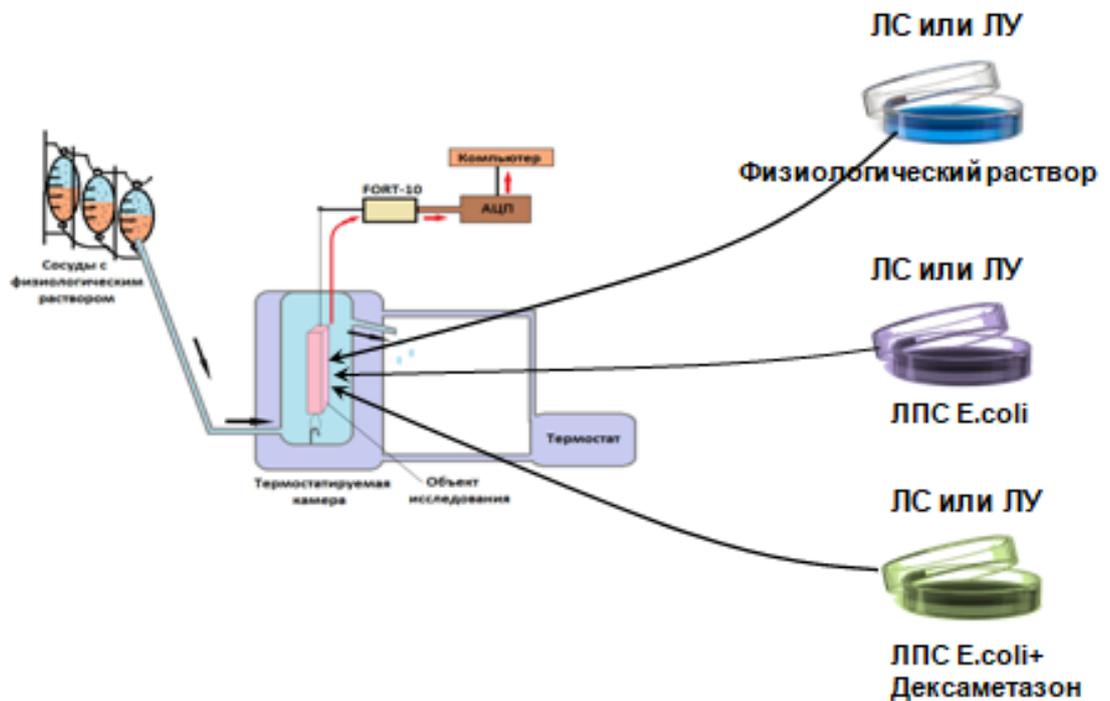


Рисунок 2.2 – Схема эксперимента

2.4. Солевые растворы: состав, температура, оксигенация

Эксперименты проводили при непрерывном протоке физиологического солевого раствора следующего состава (в мМ): 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 сатурировали 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).

В исследованиях использовали следующие препараты:

1. Анакинра (Kineret) (Swedish Orphan Biovitrum) - 1 мг/мл. Анакинра применяли в качестве антагониста рецепторов интерлейкина-1β;
2. Альбумин бычий сывороточный (Bovine Serum Albumin, Sigma-Aldrich), 1%;
3. Ацетилхолин (Acetylcholine chloride, Sigma-Aldrich) 1×10^{-6} М;
4. Гидрокортизон (SOLU-CORTEF, Pfizer MFG, Бельгия) 1 мг/л и 10 мг/л. Растворитель для гидрокортизона, поставляемый в комплекте SOLU-CORTEF;
5. Глибенкламид (Glibenclamide, MP Biomedicals), 10 мкмоль/л. Глибенкламид растворяли в этаноле (2 мг/мл). Полученный раствор добавляли в физиологический раствор до достижения необходимой концентрации. Растворитель в разведении 1/1000 не вызывали значимых изменений параметров сократительной активности ЛС и ЛУ.

Глибенкламид использовали в качестве блокатора АТФ-чувствительных K^+ -каналов;

6. Дексаметазон (Dexamethasone, Sigma-Aldrich), 0,04 мг/л и 0,4 мг/л. Дексаметазон предварительно растворяли в ДМСО (диметилсульфоксид, «Химреактивкомплект», РФ) с последующим разведением в физиологическом растворе до необходимой концентрации.
7. Династат (Dynastat, Pfizer Inc.), 3 мг/л. Династат использовали в качестве селективного ингибитора циклооксигеназы-2 (СОХ-2);
8. Индометацин (Indomethacin, Sigma-Aldrich), 1×10^{-5} М. Индометацин использовали в качестве ингибитора циклооксигеназы, растворяли в ДМСО в концентрации 10^{-2} М/л и перед воздействием разбавляли физиологическим раствором до концентрации $1,0 \times 10^{-5}$ М;
9. Липополисахарид (ЛПС *Escherichia coli* O55:B5, Sigma-Aldrich), 10 мкг/мл.
10. Норадреналин (\pm)-Norepinephrine (+)-bitartrate salt (Sigma-Aldrich), 1×10^{-6} М;
11. Тетраэтиламмоний (ТЭА) (Tetraethylammonium chloride, Sigma-Aldrich), 1×10^{-3} М/л. ТЭА использовали в качестве блокатора Ca^{2+} -чувствительных K^+ -каналов большой проводимости.
12. Празозин (Prazosin hydrochloride, Sigma-Aldrich), 1×10^{-6} М;
13. Цефамандол (АБОЛмед, Россия), 25 мкг/мл. Антибиотик широкого спектра действия.
14. Арамин (Sigma-Aldrich), 0,5 μ М/л. Арамин (апамин) использовали в качестве блокатора Ca^{2+} -чувствительных K^+ -каналов малой проводимости;
15. Charybdotoxin (Sigma-Aldrich), 0,1 μ М/л. Charybdotoxin (харибдотоксин) использовали в качестве блокатора Ca^{2+} -чувствительных K^+ -каналов средней и большой проводимости.
16. Intron A[®], IFN- α -2b (Merck Sharp & Dohme Corp.), 250-1000 МЕ/мл;

17. Rebif[®], IFN- β -1a (Merck Serono S.p.A.), 600-1200 МЕ/мл;
18. Ингарон[®], IFN- γ (НПП Фармаклон), 500-1000 МЕ/мл;
19. IL-1 β (беталейкин, НИИОЧБП, Санкт-Петербург, РФ) – 2×10^{-12} - 2×10^{-10} М;
20. IL-2 (ронколейкин, ООО «НПК «БИОТЕХ» Санкт-Петербург, РФ) – 4×10^{-12} - 4×10^{-10} М;
21. N ω -nitro-L-arginine methyl ester – L-NAME (ICN Biomedicals), 1×10^{-4} М. L-NAME применяли в качестве ингибитора эндотелиальной синтазы NO;
22. LY-294002 (Sigma-Aldrich), 1×10^{-5} М. LY-294002 применяли в качестве ингибитора фосфатидилинозитол-3-киназы;
23. 1400W (1400W dihydrochloride, Sigma-Aldrich), 2×10^{-5} М. 1400W использовали в качестве селективного ингибитора iNOS;
24. RO1138452 (4,5-dihydro-1H-imidazol-2-yl)-[4-(4-isopropoxy-benzyl)-phenyl]-amine, R&D Systems), 1×10^{-6} М. RO1138452 использовали в качестве селективного антагониста IP-рецепторов;
25. GW627368X(N-{2-[4-(4,9-diethoxy-1-oxo-1,3-dihydro-2H benzo[f]isoindol-2-yl)phenyl]acetyl} benzene sulphonamide, Cayman Chemical), 2×10^{-5} М. GW627368X растворяли в ДМСО. Полученный раствор добавляли в физиологический раствор до достижения необходимой концентрации. GW627368X использовали в качестве антагониста EP₄-рецепторов;
26. Y-27632 (Sigma-Aldrich), 1×10^{-8} М. Y-27632 использовали в качестве ингибитора Rho-киназы.

Растворители (растворитель для гидрокортизона в комплекте SOLU-CORTEF; ДМСО, этанол) в разведении в физиологическом растворе 1/1000 не вызывали статистически значимых изменений параметров сократительной активности ЛС и ЛУ.

2.5. Регистрация сократительной активности

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 обрабатывалась программой Labmaster с использованием пакета прикладных программ MATLAB (Рисунок 2.3). Предметами исследования являются тонус, амплитуда и частота фазных сокращений лимфатических сосудов и узлов.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программы «StatSoft STATISTICA 6.1.478». Поскольку полученные данные имели нормальное распределение, они представлены в виде средних значений с их стандартным отклонением ($M \pm SE$). Для установления достоверности различий использовали t-критерий Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$ [65].

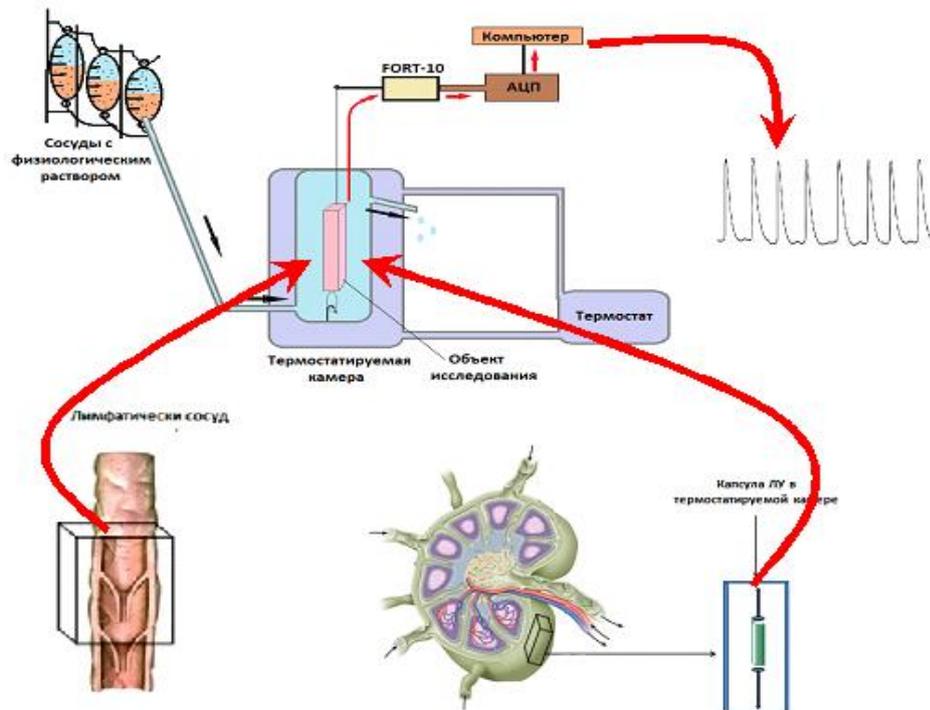


Рисунок 2.3 – Схема рабочей установки

ГЛАВА 3

ВЛИЯНИЕ ИНТЕРФЕРОНОВ НА СОКРАТИТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ЛИМФАТИЧЕСКИХ СОСУДОВ И УЗЛОВ

Изучение цитокинов началось еще в 40-е годы XX в. Названия цитокинам присваивали согласно выявленному биологическому эффекту. Так интерфероны (IFN) получили свое название благодаря своей способности повышать сопротивляемость организма при повторной вирусной инфекции. Революционный поворот произошел в начале 80-х годов после клонирования генов интерферона мыши и человека, получения рекомбинантных молекул, полностью повторявших биологические свойства природных цитокинов. Интерфероны, как и большинство цитокинов - типичные индуцибельные медиаторы воспаления и в постнатальном периоде не синтезируются клетками вне воспалительной реакции и иммунного ответа. Существует как минимум 14 вариантов интерферонов- α (продуктов лейкоцитов), несколько разновидностей интерферонов- β (продуктов фибробластов) и интерферон- γ (продукт Т-хелперов 1 типа и естественных киллеров) [36].

Наиболее исследованная группа цитокинов - интерфероны I типа, обладающие противовирусной и антипролиферативной активностью. Основное предназначение интерферонов α и β состоит в осуществлении защиты от вирусов. При вирусной инфекции пораженные клетки синтезируют эти интерфероны, которые поступают в межклеточное пространство и связываются с рецепторами соседних непораженных вирусом клеток. После этого они влияют на гены, ответственные за синтез протеинкиназ, снижающих трансляцию мРНК и, соответственно, синтез белков капсида вируса. Также эти интерфероны инициируют синтез протеинов, угнетающих транскрипцию вирусных генов, и активируют латентную эндонуклеазу, приводящую к деградации РНК (как вируса,

так и клетки-хозяина). Таким образом, интерфероны α и β действуют на всех трёх уровнях синтеза белка — на собственно вирусную РНК как источник генетической информации, на процессы транскрипции и трансляции. Результат действия таких интерферонов состоит в образовании вокруг очага поражения барьера из клеток, не способных обеспечить репродукцию вируса [81, 162].

Известны иммуносупрессивные эффекты IFN- β , которые коррелируют с усилением продуцирования иммуносупрессивных цитокинов, особенно IL-4 и IL-10. В свою очередь, IL-10 имеет важные иммунорегуляторные особенности, включая подавление антигенспецифической пролиферации клеток Th1, что усиливается активностью IFN- β [255].

Интерферон γ (IFN- γ) в организме образуется Т-хелперами, Т-киллерами, НК-клетками и дендритными клетками [246]. Он обладает противовирусным и иммуномодулирующим действием, является активатором макрофагов и усиливает их противоопухолевую активность, усиливает противоопухолевое действие цитотоксических лимфоцитов, подавляет рост опухолевых клеток. Высокоаффинные рецепторы к IFN- γ имеются на поверхности большинства клеток организма, в т.ч. на эндотелиальных и гладкомышечных клетках [183].

Благодаря своим эффектам интерфероны включены в современные направления в лечении вирусных инфекций и некоторых злокачественных опухолей, интерфероны могут применяться как в виде монотерапии, так и в комплексе с другими препаратами [218, 219]. Препараты интерферонов обладают противовирусным, антибактериальным, антипролиферативным, противоопухолевым, а также иммуномодулирующим и радиопротекторным эффектом, играя контрольно-регуляторную роль в процессах поддержания иммунологического гомеостаза. Все интерфероны выполняют основную функцию — поддержание нуклеинового гомеостаза организма путем непосредственной защиты от экспрессии инородного генетического материала. Спектр заболеваний,

при которых показано использование IFN, представлен тремя большими группами: вирусными инфекциями, онкологическими заболеваниями и демиелинизирующими заболеваниями ЦНС, к которым относится рассеянный склероз.

Несмотря на то, что интерфероны являются официальными препаратами и достаточно часто применяются в клинике в качестве иммуномодуляторов, их действие на активную транспортную функцию ЛС и ЛУ не изучено, что и послужило основанием для проведения данного исследования.

3.1. Сократительная функция лимфатических сосудов при действии интерферонов IFN- α -2b, IFN- β -1a и IFN- γ

Объектами исследования служили брыжеечные постнодальные ЛС диаметром 1,5 – 2,0 мм (n=24) быка. Через 30 мин после помещения препаратов в термостатируемую камеру с физиологическим раствором и создания натяжения, близкого к физиологическому, устанавливался стабильный уровень тонуса, на фоне которого регистрировались спонтанные фазные сокращения. Расчетным путем нами была определена концентрация IFN- α -2b, IFN- β -1a и IFN- γ в экстраклеточной жидкости у человека массой 70 кг при введении терапевтической дозы препарата без учета фармакодинамики. Для IFN- α -2b использовались концентрации 250 МЕ/мл, 500 МЕ/мл и 1000 МЕ/мл. IFN- β -1a применялся в концентрации 600 МЕ/мл, 1000 МЕ/мл и 1200 МЕ/мл. IFN- γ применялся в концентрации 500 МЕ/мл и 1000 МЕ/мл.

В рабочую камеру вводили IFN- α -2b в концентрации 250 МЕ/мл. На фоне действия интерферона наблюдался ингибиторный эффект на сократительную активность ГМК ЛС. На 3-4 минутах действия IFN- α -2b регистрировалось

снижение тонуса ЛС. На фоне снижения тонуса происходило снижение амплитуды и частоты спонтанных фазных сокращений. Спонтанная фазная сократительная активность ЛС прекратилась в среднем на $11,3 \pm 1,6$ мин (Рисунок 3.1). После удаления IFN- α -2b из раствора наблюдалось медленное восстановление сократительной активности ЛС.

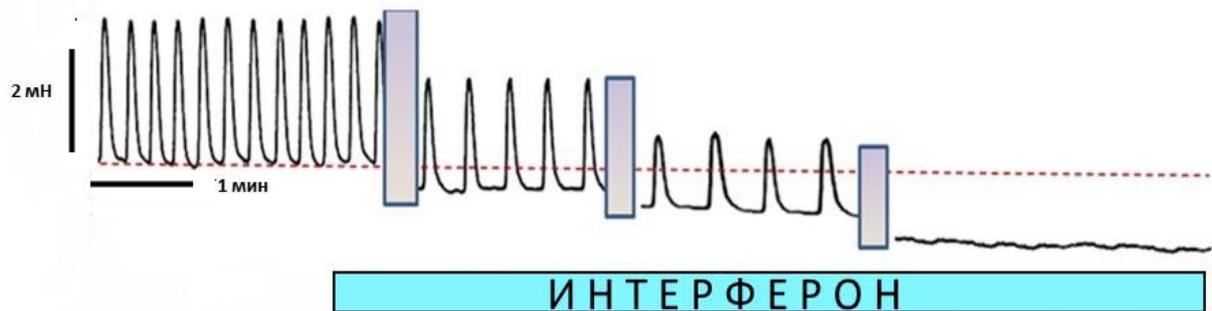


Рисунок 3.1 – Действие IFN- α -2b в концентрации 250 МЕ/мл на сократительную активность лимфатического сосуда

Примечание. Разрывы кривой соответствуют 3-минутной остановке записи. Пунктирной линией обозначен исходный тонус препарата.

Повышение концентрации IFN- α -2b в растворе до 500 МЕ/мл приводило к быстро развивающимся отрицательным инотропному и хронотропному эффектам. На первых минутах воздействия наблюдалось снижение тонуса и уменьшение амплитуды фазных сокращений ЛС. Спонтанная фазная сократительная активность на фоне сниженного тонуса в ЛС прекратилась в среднем на $4,3 \pm 0,5$ мин. К этому времени тонус ЛС снизился на $24,3 \pm 3,3\%$ от исходного. Ингибиторный эффект IFN- α -2b в концентрации 500 МЕ/мл на ЛС был обратимым, но восстановление параметров фазной сократительной активности и тонуса происходило медленно.

Дальнейшее увеличение концентрации IFN- α -2b до 1000 МЕ/мл приводило к выраженному ингибиторному эффекту уже на первых минутах действия: тонус быстро снижался, и через 2-3 минуты спонтанная фазная активность прекращалась и восстанавливалась в среднем на $27,3 \pm 2,1$ мин после удаления интерферона из раствора.

Реакции ЛС на введение в физиологический раствор IFN- β -1a в общих чертах были схожими с эффектами IFN- α -2b. IFN- β -1a в концентрации 600 МЕ/мл (50% от рассчитанной концентрации в экстраклеточной жидкости при введении терапевтической дозы) уже на первых минутах действия приводил к снижению тонического напряжения ЛС, на фоне которого уменьшались амплитуда и частота спонтанных фазных сокращений. Спонтанная фазная сократительная активность на фоне сниженного тонуса ЛС прекратилась в среднем на $4,8 \pm 0,6$ мин. К этому времени тонус ЛС снизился на $19,6 \pm 2,7\%$ от исходного.

Ингибиторный эффект IFN- β -1a в концентрации 1200 МЕ/мл на ЛС был более выраженным, и последствие сохранялось довольно долго: на протяжении 1 часа после удаления IFN- β -1a из раствора тонус препаратов не восстановился, а фазные сокращения ЛС были неритмичными, редкими и низкоамплитудными.

Схема исследования эффектов IFN- γ на сократительную функцию брыжеечных ЛС быка была аналогичной. Введение IFN- γ (500 МЕ/мл) в рабочую камеру с интактным ЛС вызывало 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.

3.2. Механизмы действия интерферонов IFN- α -2b , IFN- β -1a и IFN- γ на сократительную функцию лимфатических сосудов

Известно, что эндотелий может приводить к расслаблению сосудистых гладких мышц посредством продукции трех вазодилататоров – NO, простациклина и эндотелиального гиперполяризующего фактора [97, 204, 218]. Эндотелиальные вазоактивные факторы могут выделяться как спонтанно, так и под влиянием различных физических и химических факторов (биогенных аминов, интерферонов и др.), и приводить как к понижению тонуса миоцитов лимфатических сосудов, так и к констрикторному эффекту. Оксид азота (NO) образуется в эндотелиальных клетках в процессе трансформации L-аргинина под воздействием NO-синтетазы. Интерфероны увеличивают продукцию оксида азота путем активации фермента NO-синтетазы [28, 34]. В ГМК NO активирует растворимую гуанилатциклазу, которая переводит гуанозинтрифосфат (ГТФ) в циклический гуанозинмонофосфат (цГМФ), содержание цГМФ в цитоплазме ГМК сосудов повышается, что приводит к дефосфорилированию легких цепей миозина и расслаблению гладкой мускулатуры [114, 159].

К метаболитам арахидоновой кислоты относится простациклин, являющийся важнейшим физиологическим регулятором микроциркуляции [25]. Простациклин, синтезируемый эндотелием, вызывает вазодилатацию. Имеются данные, что под влиянием простациклина сокращения брыжеечных лимфатических сосудов быка и морской свинки уменьшаются по амплитуде и частоте [174]. Для исключения вмешательства указанных факторов в лимфатических сосудах было проведено механическое удаление эндотелиального слоя. На деэндотелизированные ЛС IFN- α -2b в концентрации 500 МЕ/мл, IFN- β -1a в концентрации 600 МЕ/мл и IFN- γ в концентрации 500 МЕ/мл оказывали слабый ингибиторный эффект. Наблюдалось снижение тонуса, однако оно было значительно меньшим по сравнению с интактными препаратами. Спонтанная фазная активность не прекращалась, хотя было отмечено урежение ритма и

снижение амплитуды. Эти данные позволили предположить, что тормозный эффект указанных интерферонов на сократительную активность ГМК ЛС является в значительной степени эндотелий-зависимым. Дальнейшие исследования IFN- α -2b (500 МЕ/мл), IFN- β -1a (600 МЕ/мл) и IFN- γ (500 МЕ/мл) мы проводили по одинаковой схеме.

Известно, что к выраженному снижению тонуса миоцитов и уменьшению параметров фазной активности лимфатических сосудов приводит увеличение активности эндотелиальной синтазы NO [140, 231, 274]. С целью исключения ее влияния мы использовали ингибитор синтазы NO - L-NAME.

После введения в раствор интерферона наблюдалось полное прекращение спонтанной фазной активности, после чего добавляли L-NAME. В присутствии L-NAME тонус лимфатических сосудов медленно повышался и через 8-10 минут устанавливался на новом, относительно стабильном уровне (Рисунок 3.2 и 3.3). Повышение тонуса в ЛС при действии L-NAME на фоне интерферона составило $28,5 \pm 1,8\%$ от величины дилатации, вызванной применением IFN- α -2b.

Наряду с NO в расслаблении сосудистых гладких мышц принимает участие простаглицлин. Простаглицлин образуется из эндопероксидов простаглицлинов (простаглицлины G2 и H2) клетками сосудистого эндотелия из арахидоновой кислоты. Основными ферментами, ответственными за биосинтез данного соединения, являются циклооксигеназа (способствует образованию простаглицлина G2 из арахидоновой кислоты, а затем образованию простаглицлина H2) и простаглицлин-синтаза (отвечает за превращение простаглицлина H2 в простаглицлин) [270].

Допустив возможное участие простаглицлина в механизме реализации ингибиторного эффекта интерферонов на ЛС, мы провели две серии экспериментов. В первой к раствору после расслабления препаратов под действием интерферонов добавляли ингибитор циклооксигеназы – индометацин,

во втором – в раствор одновременно добавляли L-NAME и индометацин и в последующем сопоставляли реакции препаратов на L-NAME и реакции на два вещества. В ЛС применение индометацина на фоне действия интерферона и L-NAME сопровождалось незначительным приростом тонуса (на $7,8 \pm 0,9\%$).

При исследовании механизмов эндотелий-зависимых сосудорасширяющих реакций было обнаружено, что в некоторых сосудах определенное значение имеет гиперполяризация ГМК сосудов, не связанная с действием NO и простаглицлина [154]. В наших опытах по изучению возможного участия эндотелиального гиперполяризующего фактора (EDHF) в реализации ингибиторного эффекта интерферонов, производство NO и простаглицлина, индуцируемые интерфероном, предварительно блокировали посредством торможения NO-синтазы L-NAME, а циклооксигеназы - индометацином. После ингибирования синтеза NO и простаглицлина и установления нового стабильного уровня тонуса препаратов, в раствор вводили апамин (apamin) – блокатор Ca^{2+} -чувствительных K^+ -каналов малой проводимости, и харибдотоксин (charybdotoxin), являющийся блокатором Ca^{2+} -чувствительных K^+ -каналов средней и большой проводимости [97, 229]. Введение этих веществ довольно быстро приводило к выраженному повышению тонуса препаратов. Этот эффект составил $38,0 \pm 3,2\%$ от амплитуды расслабления, вызванной применением интерферона (Рисунок 3.2 и 3.3).

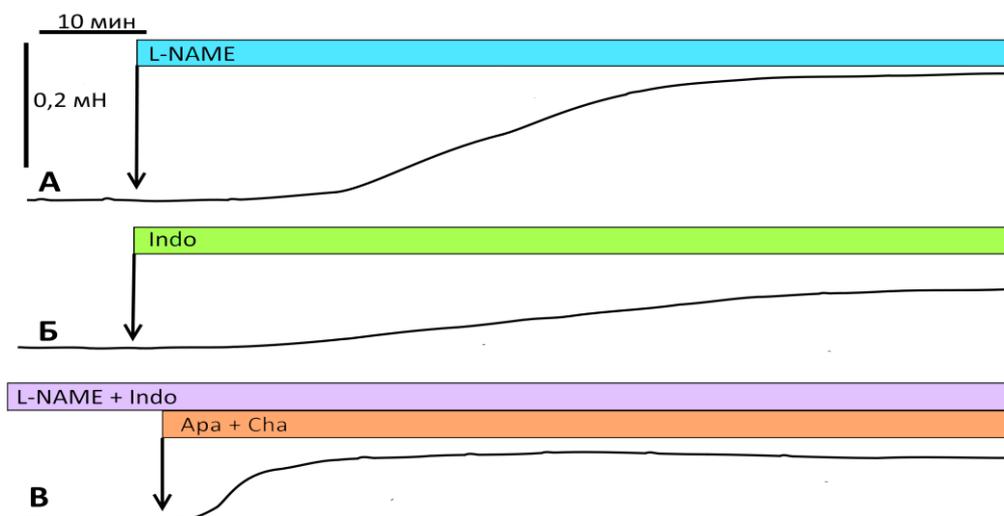


Рисунок 3.2 – Изменения тонуса брыжеечного лимфатического сосуда быка при применении различных ингибиторов синтеза вазодилататоров на фоне действия интерферона IFN- α -2b (500 ME/мл)

Примечание. 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.

Ниже представлены усредненные данные исследований эндотелий-опосредованных механизмов действия интерферона на лимфатические сосуды.

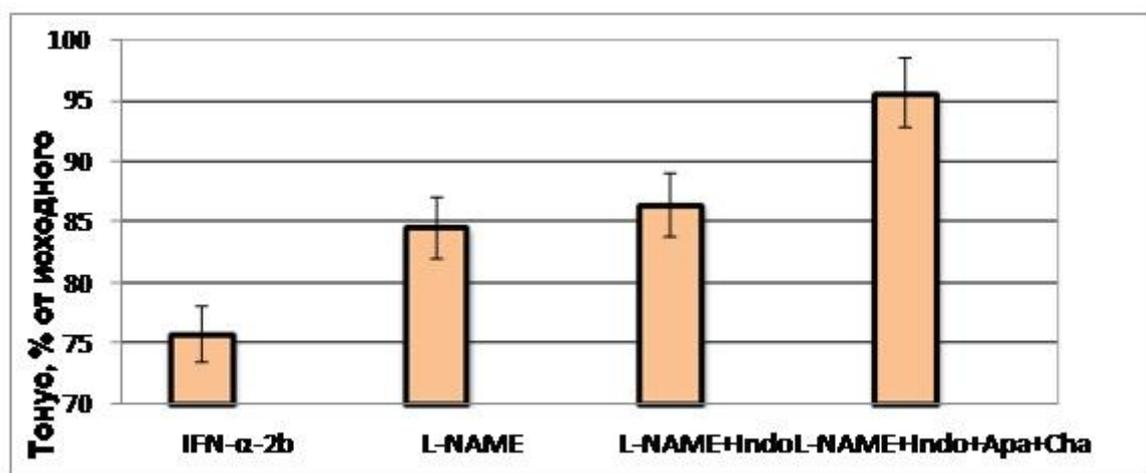


Рисунок 3.3 – Изменения тонуса брыжеечных лимфатических сосудов быка при действии интерферона IFN- α -2b (500 ME/мл) на фоне применения ингибиторов эндотелиальных вазодилататоров

Дилататорный эффект IFN- γ на деэндотелизированные ЛС был значительно слабее по сравнению с интактными, что позволило предположить преимущественно эндотелий-зависимый 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 эндотелий-зависимой 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 нам основание заключить об активации интерфероном- γ Ca^{2+} -чувствительных K^+ -каналов большой проводимости на эндотелиоцитах и гладкомышечных клетках ЛС. Ранее важное значение Ca^{2+} -чувствительных K^+ -каналов большой проводимости на мембране ГМК в вазодилатации было показано при исследовании артерий различных животных. Их активация сопровождается гиперполяризациями мембраны ГМК, снижением концентрации внутриклеточного Ca^{2+} и расслаблением миоцитов [156].

3.3. Сократительная функция лимфатических узлов при действии интерферонов IFN- α -2b, IFN- β -1a и IFN- γ

Объектами исследования служили брыжеечные ЛУ (n=21) быка. Полоски капсулы ЛУ помещали в термостатируемую камеру с физиологическим раствором и создавали натяжение, близкое к физиологическому. IFN- α -2b в концентрации 250 МЕ/мл оказывал ингибиторный эффект на сократительную активность ГМК ЛУ. На 6-8 минутах действия IFN- α -2b регистрировалось снижение тонуса ЛУ с последующим снижением амплитуды и частоты спонтанных фазных сокращений.

Прекращение спонтанной фазной сократительной активности ЛУ в среднем отмечалось на $18,6 \pm 2,1$ мин. При удалении IFN- α -2b из раствора наблюдалось медленное восстановление сократительной активности ЛУ.

Увеличение концентрации IFN- α -2b в растворе до 500 МЕ/мл приводило к быстро развивающимся отрицательным инотропному и хронотропному эффектам. Снижение тонуса и уменьшение амплитуды фазных сокращений ЛУ наблюдалось в течение первых минут воздействия. На фоне сниженного тонуса в ЛУ прекратилась спонтанная фазная сократительная активность в среднем на $7,8 \pm 0,7$ мин. К этому времени тонус ЛУ снизился на $18,8 \pm 1,5\%$ от исходного. Ингибиторный эффект IFN- α -2b в концентрации 500 МЕ/мл на ЛУ был обратимым, но восстановление параметров фазной сократительной активности и тонуса происходило медленно.

Последующее возрастание концентрации IFN- α -2b до 1000 МЕ/мл приводило к выраженному ингибиторному эффекту уже на первых минутах действия: тонус быстро снижался, и через 2-3 минуты прекращалась спонтанная фазная активность (Рисунок 3.4).

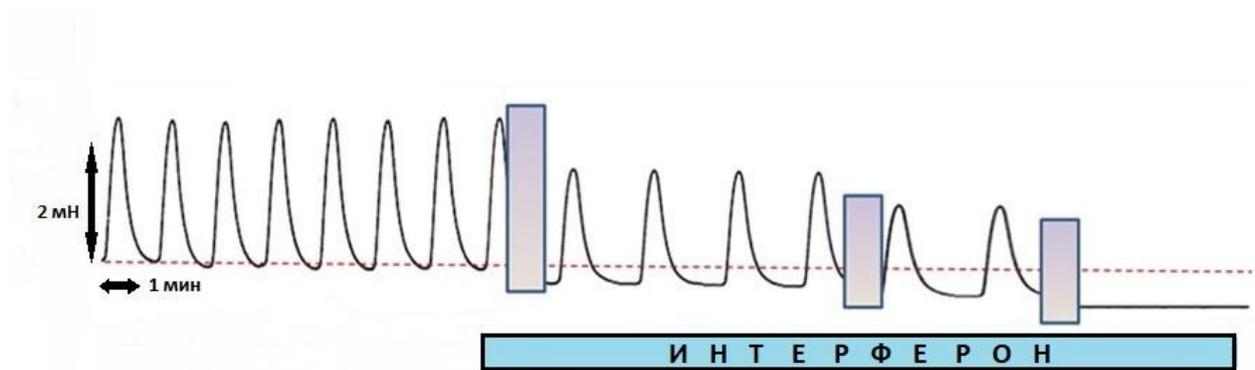


Рисунок 3.4 – Действие IFN- α -2b в концентрации 250 МЕ/мл на сократительную активность лимфатического узла

Примечание. Разрывы кривой соответствуют 5-минутной остановке записи. Пунктирной линией обозначен исходный тонус препарата.

Реакции ЛУ на введение в физиологический раствор IFN- β -1a были схожими с эффектами IFN- α -2b. IFN- β -1a в концентрации 600 МЕ/мл в течение первых минут действия приводил к снижению тонического напряжения ЛУ, уменьшению амплитуды и частоты спонтанных фазных сокращений. Прекращение спонтанной фазной сократительной активности на фоне сниженного тонуса в ЛУ прекратилась в среднем на $6,9 \pm 1,14$ мин. Тонус ЛУ к этому времени снизился на $23,7 \pm 3,13\%$ от исходного.

Ингибиторный эффект IFN- β -1a в концентрации 1200 МЕ/мл на ЛУ был обратимым, но с сильно выраженным последствием воздействия. После удаления IFN- β -1a из раствора фазные сокращения ЛУ были неритмичными, редкими и низкоамплитудными, тонус препаратов не восстановился.

IFN- γ при действии на интактные полоски капсулы ЛУ (с сохраненным субкапсулярным синусом) оказывал ингибиторный эффект на сократительную функцию ЛУ, а в концентрации выше 1000 МЕ/мл полностью подавлял фазную сократительную активность.

На деэндотелизированные полоски капсулы IFN- γ оказывали слабый тормозный эффект, снижение тонуса было значительно меньшим по сравнению с интактными препаратами, спонтанная фазная активность не прекращалась, однако, наблюдалось урежение ритма и снижение амплитуды фазных сокращений.

3.4. Механизмы действия интерферонов IFN- α -2b, IFN- β -1a и IFN- γ на сократительную функцию лимфатических узлов

Интерфероны ЛУ IFN- α -2b в концентрации 500 МЕ/мл, IFN- β -1a в концентрации 600 МЕ/мл и IFN- γ в концентрации 500 МЕ/мл оказывали слабый ингибиторный эффект на ЛУ с удаленным слоем эндотелия. Регистрировалось снижение тонуса, но оно было значительно меньшим по сравнению с интактными препаратами. Спонтанная фазная активность не прекращалась, однако было отмечено урежение ритма и снижение амплитуды. С учетом изложенного, мы предположили, что тормозный эффект интерферонов на сократительную активность ГМК ЛУ, как и в ЛС, является в значительной степени эндотелий-зависимым. В наших экспериментах было установлено, что эффекты интерферонов на сократительную функцию ГМК ЛУ являются схожими, дальнейшие исследования IFN- α -2b (500 МЕ/мл), IFN- β -1a (600 МЕ/мл) и IFN- γ (500 МЕ/мл), мы проводили по одинаковой схеме.

Эндотелиальная ткань играет огромную роль в регуляции функции ЛУ, причем особое значение имеет эндотелиальный сосудорасширяющий фактор – монооксид азота. NO синтезируется из аминокислоты L-аргинина с помощью фермента NO-синтазы, активация которого приводит к увеличению продукции NO. Таким образом, воздействие увеличенных доз NO приводит к снижению тонуса миоцитов и уменьшению параметров фазной активности капсулы ЛУ [140, 274]. В экспериментах для исключения влияния NO-синтазы используют ингибитор синтазы NO - L-NAME.

После введения в раствор интерферона наблюдалось полное прекращение спонтанной фазной активности, после чего добавляли L-NAME. В присутствии L-NAME тонус лимфатических узлов медленно повышался и через 8-10 минут устанавливался на новом, относительно стабильном уровне (Рисунок 3.5). В ЛУ

эффект L-NAME составил $22,7 \pm 3,2\%$ от величины дилатации, вызванной применением IFN- α -2b.

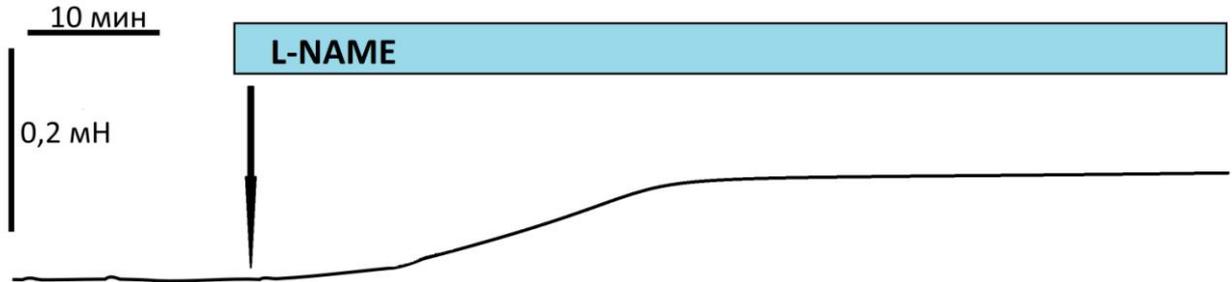


Рисунок 3.5 – Изменения тонуса брыжеечного лимфатического узла быка при применении ингибитора синтазы NO – L-NAME на фоне действия интерферона IFN- α -2b (500 МЕ/мл)

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.

Эндотелий-зависимые сосудорасширяющие реакции реализуются не только за счёт действия NO, но и активации механизмов, опосредованных простаглицлином [25]. Основными эффектами простаглицлина являются торможение агрегации тромбоцитов и вазодилатация. Простаглицлин оказывает непосредственное влияние, как правило, на месте своего образования, так как

быстро инактивируется неэнзиматическим путём с образованием метаболита 6-кето-простагландина F1 α [277].

Мы предположили участие простаглицлина в механизме реализации ингибиторного эффекта интерферонов на ЛУ. На основании этого нами были проведены две серии экспериментов. Первая серия экспериментов проводилась с участием ингибитора циклооксигеназы – индометацина, который вводился в раствор после расслабления препаратов под действием интерферонов. Применение в опытах с интактными полосками капсулы ЛУ индометацина, снижало релаксационный эффект всех трех интерферонов. Максимальное снижение релаксационного эффекта наблюдалось при действии индометацина на фоне IFN- β -1a, минимальное – на фоне IFN- γ .

Во второй серии экспериментов в раствор одновременно добавляли L-NAME и индометацин. После проведения экспериментов сопоставлялись реакции препаратов на L-NAME и реакции на два вещества.

Установлено, что в ЛУ применение индометацина на фоне действия интерферона и L-NAME приводило к выраженному дополнительному возрастанию тонуса (на $31,9 \pm 3,86\%$) (Рисунок 3.6).

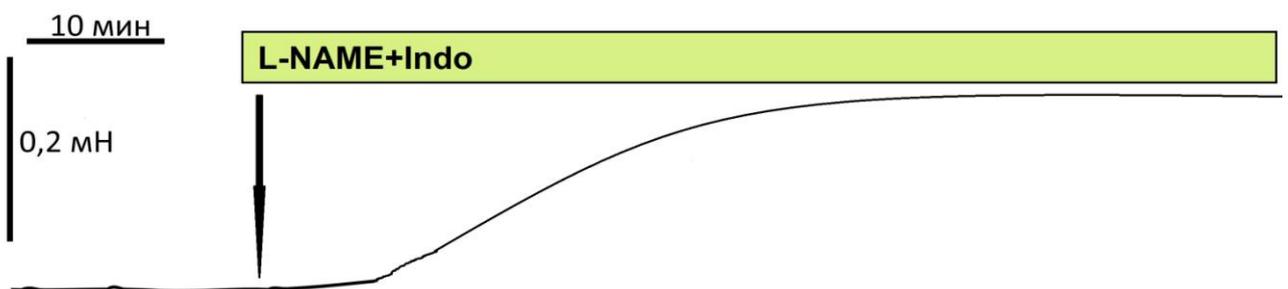


Рисунок 3.6 – Изменение тонуса брыжеечного лимфатического узла быка при применении ингибиторов L-NAME и индометацина (Indo) на фоне действия интерферона IFN- α -2b (500 ME/мл)

В условиях одновременного ингибирования синтеза NO и простаглицлина за эндотелий-зависимую вазодилатацию отвечает EDHF [216]. В наших опытах для изучения возможного участия EDHF в реализации ингибиторного эффекта интерферонов, последовательно блокировалось образование NO введением L-NAME и простаглицлина – индометацином.

После ингибирования синтеза NO и простаглицлина и установления нового стабильного уровня тонуса препаратов, в раствор вводили aramin – блокатор Ca^{2+} -чувствительных K^+ -каналов малой проводимости, и harybdotoxin, являющийся блокатором Ca^{2+} -чувствительных K^+ -каналов средней и большой проводимости [97, 229]. Введение этих веществ в короткий срок приводило к повышению тонуса препаратов, в ЛУ прирост составил $10,3 \pm 1,3\%$ от амплитуды расслабления, вызванной применением интерферона. (Рисунок 3.7). Ингибирование Ca^{2+} -чувствительных K^+ -каналов приводило к снижению амплитуды расслабления ЛУ.

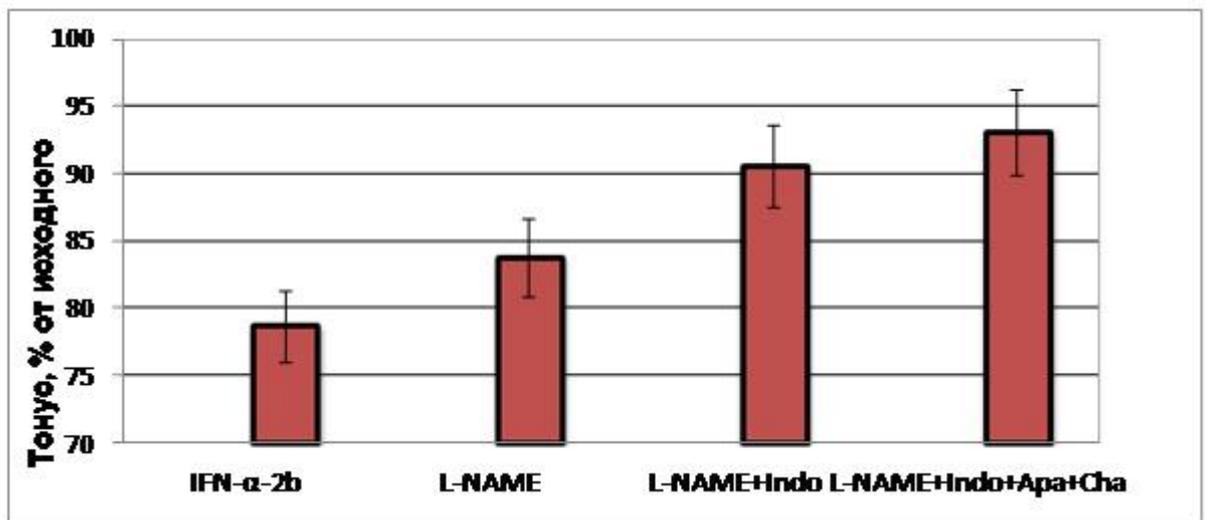


Рисунок 3.7 – Изменения тонуса брыжеечных лимфатических узлов быка при действии интерферона IFN- α -2b (500 ME/мл) на фоне ингибирования продукции эндотелиальных вазодилататоров

Примечание. IFN- α -2b (500 МЕ/мл); действия L-NAME на фоне интерферона IFN- α -2b; действия L-NAME+индометацин на фоне интерферона IFN- α -2b; действия L-NAME+индометацин+aramin+charybdotoxin на фоне интерферона IFN- α -2b.

3.5. Резюме

Исследования были проведены на изолированных брыжеечных лимфатических сосудах и узлах быка, изучались эффекты и механизмы действия интерферонов IFN- α -2b, IFN- β -1a и IFN- γ на фазные и тонические сокращения ЛС и ЛУ. Установлено, что интерфероны оказывают дозо-зависимый отрицательный хронотропный и инотропный эффект на спонтанные фазные сокращения и тонус ЛС и ЛУ. В деэндотелизированных ЛС и ЛУ интерфероны оказывали меньший ингибиторный эффект на спонтанные сокращения и тонус.

Показано, что интерфероны при взаимодействии с ЛС и ЛУ активируют в эндотелиальных клетках три сигнальных пути, приводящие к расслаблению ГМК. В ЛС преобладающими является NO-зависимый механизм дилатации и механизм, запускаемый эндотелиальным гиперполяризующим фактором. В ЛУ интерфероны стимулируют продукцию эндотелиоцитами преимущественно NO и простациклина. Роль эндотелиального гиперполяризующего фактора в интерферон-вызванной дилатации ГМК ЛУ минимальна.

ГЛАВА 4

ЭФФЕКТЫ И МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ ИНТЕРЛЕЙКИНОВ

IL-1 β и IL-2 НА СОКРАТИТЕЛЬНУЮ ФУНКЦИЮ ЛИМФАТИЧЕСКИХ СОСУДОВ И УЗЛОВ

Известно, что первично организм реагирует на патоген развитием воспаления — неспецифической защитной реакцией, опосредованной факторами врождённой резистентности [24]. Наиболее часто микробной агрессии подвергаются клетки, выстилающие барьерные органы, а также клеточные элементы сосудов, содержащихся в них. Поэтому развитие воспаления чаще всего инициируют кератиноциты, эпителиоциты желудочного и респираторного трактов, фибробласты, а также эндотелиоциты капилляров кожи и собственной пластинки слизистых оболочек. В ответ на агрессию со стороны патогена в клетках макроорганизма активируются гены, обеспечивающие синтез доиммунных цитокинов (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12). Именно эти вещества активируют клетки врожденной резистентности (нейтрофилы и моноциты крови, тканевые макрофаги, дендритные клетки). Также известно, что эндотелиоциты под влиянием IL-1 β усиливают экспрессию молекул адгезии, начинают повышенный синтез простаглицина, с чем связана вазодилатация и повышение сосудистой проницаемости [24, 160].

Имеются данные о том, что сила иммунного ответа значительно превышает силу антигенного раздражения. Это предусматривает наличие механизмов самоусиления иммунного ответа [36]. Один их механизмов опосредован IL-2. Являясь продуктом активированных Т-хелперов, IL-2 вызывает пролиферацию как самой клетки-продуцента, так и соседних сходных клеток, а также способствует размножению и созреванию цитотоксических Т-лимфоцитов. При

этом образуется количество Т-лимфоцитов, значительно превышающее антигенную нагрузку. На мембране натуральных киллеров (NK) содержатся рецепторы к IL-2, поэтому IL-2 способен активировать NK-клетки [36, 240]. Таким образом, IL-2 активирует клеточное звено иммунитета, что повышает противоопухолевую иммунную защиту. В литературе есть сообщения об успешном применении IL-2 при лечении рака почки, меланомы и некоторых других опухолей.

Клетки-продуценты интерлейкинов IL-1 β и IL-2 представлены в значительном количестве в ЛС и ЛУ [36], очевидно, что влияние продуцируемых ими цитокинов будет распространяться и на остальное микроокружение. Однако, данных о влиянии интерлейкинов на эндотелиальные и гладкомышечные клетки ЛС и ЛУ мало [57], а они необходимы, поскольку препараты интерлейкинов являются фармакопейными, входят в группу «Иммуномодуляторы» и достаточно широко применяются в медицинской практике. В связи с этим, нами проведено исследование влияния интерлейкинов IL-1 β и IL-2 на транспортную функцию ЛС и ЛУ.

4.1. Сократительная функция лимфатических сосудов при действии интерлейкинов IL-1 β и IL-2

Объектом исследования служили брыжеечные ЛС бычков (n= 34). После установления стабильных параметров (тонус, амплитуда и частота фазных сокращений) в камеру вводили физиологический раствор с IL-1 β или IL-2 и на протяжении 30 минут регистрировали сократительную активность препаратов.

На интактные препараты IL-1 β в концентрациях ниже 10^{-12} М не оказывал статистически значимых эффектов, а в концентрациях выше 10^{-10} М приводил к подавлению фазной сократительной активности ЛС и снижению тонуса. Введение

IL-1 β в концентрации 10^{-11} М в рабочую камеру приводило к снижению всех показателей сократительной деятельности (Рисунок 4.1).

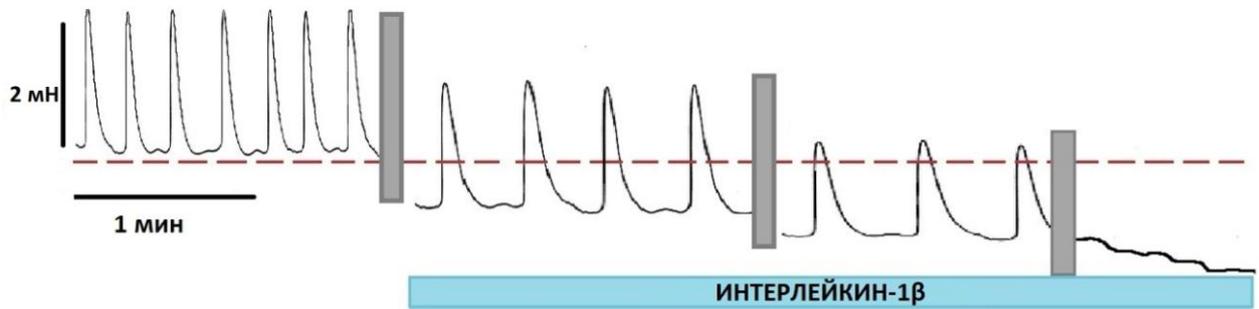


Рисунок 4.1 – Действие интерлейкина-1 β в концентрации 10^{-11} М на сократительную активность лимфатического сосуда

Примечание: Разрывы кривой соответствуют 3-минутной остановке записи. Пунктирной линией обозначен исходный тонус препарата.

При увеличении концентрации IL-1 β в промежутке от 10^{-12} М до 10^{-10} М ингибиторный эффект на гладкомышечные клетки возрастал (Рисунок 4.2). Как правило, эффект IL-1 β начинал проявляться на 4-5 минутах действия. Полностью действие IL-1 β проявлялось к 10-12 минутам, поэтому в дальнейшем для анализа использовали параметры сокращений, зарегистрированные до воздействия и в интервале 15-20 минуты действия IL-1 β .

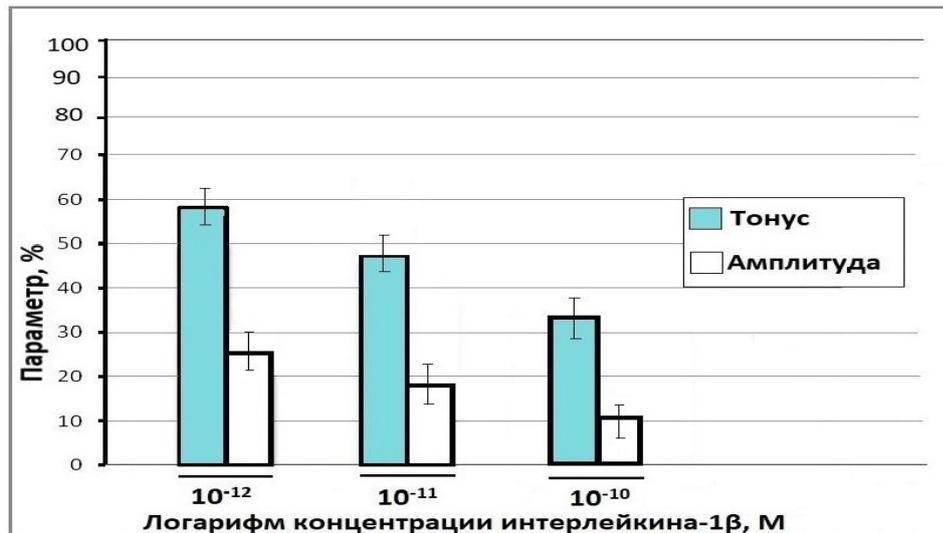


Рисунок 4.2 – Действие интерлейкина-1β на сократительную активность лимфатических сосудов (в % от исходных в физиологическом растворе)

Реакции дезнотелизированных препаратов ЛС на IL-1β сильно отличались от таковых по сравнению с интактными. Применение IL-1β в низких концентрациях сопровождалось статистически недостоверными изменениями параметров сократительной активности ГМК. IL-1β в концентрации 10⁻¹¹ М незначительно снижал тонус ГМК, а также частоту и амплитуду фазных сокращений.

IL-2 в концентрации 10⁻¹² М не приводил к достоверным изменениям сократительной активности ГМК ЛС. При повышении концентрации IL-2 в растворе до 10⁻¹¹ М на протяжении 10-15 минут происходило медленное повышение тонуса ГМК ЛС. При непрерывном протоке раствора с IL-2 на протяжении 1 часа тонус препаратов сохранялся повышенным (+22,3±2,37% в ЛС по отношению к исходному) и возвращался к исходному уровню через 20-25 минут после удаления из раствора IL-2. Повышение концентрации IL-2 до 10⁻¹⁰ М приводило к еще большему повышению тонуса ЛС. Достоверных отличий между реакциями на IL-2 интактных и дезнотелизированных ЛС не было выявлено.

4.2. Механизмы действия интерлейкинов IL-1 β и IL-2 на сократительную функцию лимфатических сосудов

Известно, что продукция IL-1 β значительно повышается в очаге, начиная с ранних стадий воспалительного процесса. Все известные биологические эффекты IL-1 β осуществляются посредством его связывания со специфическими мембранными рецепторами на различных типах клеток-мишеней. Плейотропный тип биологического действия IL-1 β проявляется, начиная с молекулярного внутриклеточного уровня. Клетками-мишенями для IL-1 β являются Т- и В-лимфоциты, макрофаги, нейтрофилы, базофилы, фибробласты, гладкомышечные и эндотелиальные клетки.

Общепризнано, что вазодилатация, вызванная рядом медиаторов, является эндотелий-зависимой реакцией, которая реализуется за счет NO, простаглицлина и эндотелиального гиперполяризующего фактора [97, 204, 218]. В наших исследованиях эффектов IL-1 β на ЛС было показано, что IL-1 β приводил к снижению всех показателей сократительной деятельности препаратов. Эффекты IL-1 β были дозозависимыми, при увеличении концентрации IL-1 β наблюдалось возрастание ингибиторного эффекта на ЛС. В опытах было отмечено достаточно быстрое проявление эффекта IL-1 β на ЛС, что по нашему мнению свидетельствует о том, что его действие реализуется через рецепторы на мембране ГМК и (или) эндотелиальных клеток ЛС. Ингибиторный эффект IL-1 β на интактные препараты предотвращался при предварительном добавлении в физиологический раствор антагониста рецепторов интерлейкина-1 β – анакинры.

С целью раскрытия механизмов действия IL-1 β , исследования проводились на препаратах, предварительно сокращенных норадреналином (5×10^{-6} М/л). Норадреналин значительно повышал тонус ЛС, при этом фазные сокращения прекращались. Таким образом, анализировался только один параметр – величина

тонического напряжения препаратов. За 15 минут до добавления в физиологический раствор $IL-1\beta$ вводили один из ингибиторов. Было установлено, что предварительная блокада эндотелиальной синтазы NO L-NAME приводила к существенному снижению ингибиторного эффекта $IL-1\beta$. После L-NAME и восстановления тонуса в раствор вводили индометацин, приводящий к подавлению синтеза простаглицина. Последующее добавление в раствор $IL-1\beta$ сопровождалась незначительным снижением тонуса ЛС. Предварительное введение в раствор апамина и харибдотоксина значительно снижало ингибирующий эффект $IL-1\beta$ в ЛС (Рисунок 4.3).

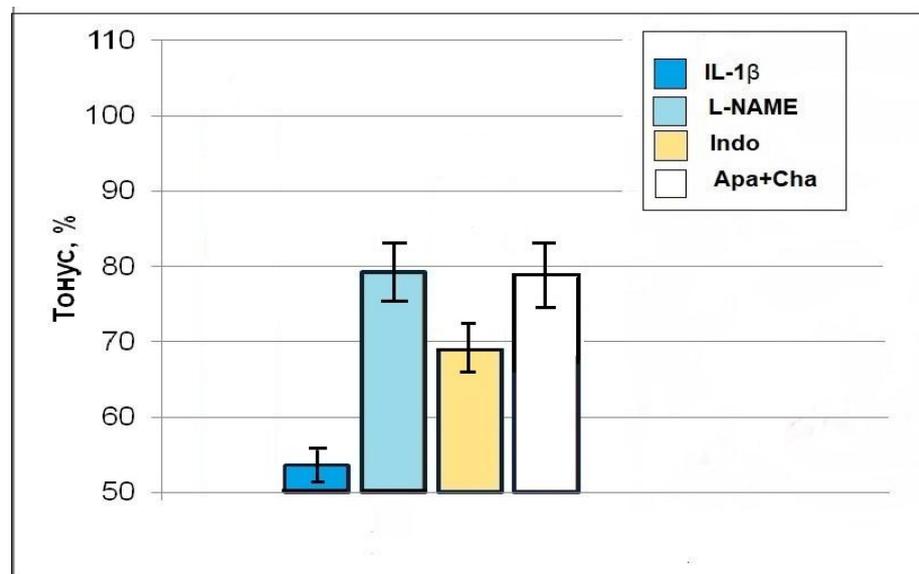


Рисунок 4.3 – Тонус лимфатических сосудов при действии интерлейкина-1 β (10^{-11} М) на фоне применения ингибиторов синтеза эндотелиальных вазодилататоров

Примечание. $IL-1\beta$ (10^{-11} М) - тонус при действии $IL-1\beta$, L-NAME – тонус при действии $IL-1\beta$ на фоне ингибитора синтазы NO; Indo – тонус при действии $IL-1\beta$ на фоне индометацина, Apa+Cha - тонус при действии $IL-1\beta$ на фоне апамина и харибдотоксина (данные представлены в % от величины тонуса в растворе с норадреналином).

Поскольку анакинра - антагонист рецепторов интерлейкина-1 β I типа, практически полностью предотвращала 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 [260]. Поскольку деэндотелизированные препараты ЛС слабо реагировали на IL-1 β и, с учетом информации о том, что на мембране эндотелиальных клеток располагается значительное количество рецепторов IL-1 I типа [37], мы полагаем, что IL-1 β взаимодействует с рецепторами на мембране эндотелиальных клеток ЛС.

Результаты применения ингибиторов нескольких сигнальных путей позволяют сделать заключение о том, что комплекс IL-1 β -рецептор активирует в эндотелиоцитах несколько сигнальных механизмов. Первый из них – активация конститутивной синтазы NO. Увеличение продукции эндотелиоцитами NO сопровождается снижением всех параметров сократительной активности ГМК ЛС. Как уже указывалось ранее, эта часть ингибирующего эффекта IL-1 β предотвращается добавлением в раствор ингибитора синтазы NO – L-NAME [226]. Второй механизм – это активация эндотелий-зависимой гиперполяризации, приводящей к расслаблению ГМК ЛС. Эта часть ингибирующего эффекта IL-1 β предотвращалась как при предварительном введении в физиологический раствор ингибиторов Ca-зависимых K⁺-каналов малой и средней проводимости – апамина и харибдотоксина, так и при добавлении этих ингибиторов на фоне действия IL-1 β [229]. Роль простаглицина в развитии ингибиторного эффекта IL-1 β незначительна. Есть основания полагать, что на мембране ГМК ЛС нет (или мало) рецепторов к IL-1 β и они не играют значимой роли в реакции ЛС на IL-1 β .

В литературе нет данных о наличии рецепторов к IL-2 на эндотелиальных или гладкомышечных клетках ЛС [121]. В то же время показано, что в стенке кровеносных сосудов в ряде случаев выявляется достаточно высокая концентрация IL-2. Имеются данные о том, что IL-2 активирует в клетках, как минимум, три внутриклеточных сигнальных пути, в т.ч. стимулирует

фосфоинозитидный механизм, функционирующий в ГМК [160]. С целью оценки возможной роли этого сигнального пути в повышении тонуса ГМК ЛС мы провели опыты с применением LY-294002, являющегося ингибитором фосфоинозитид-3-киназы [254]. На фоне блокады фосфоинозитид-3-киназы IL-2 в концентрациях 10^{-12} М – 10^{-10} М не приводил к достоверным изменениям параметров сократительной деятельности ГМК ЛС. Таким образом, IL-2 снижает транспортную функцию ЛС за счет повышения тонуса ГМК и увеличения гидродинамического сопротивления ЛС. Механизм действия IL-2 заключается в активации в ГМК фосфоинозитид-3-киназы.

4.3. Сократительная функция лимфатических узлов при действии интерлейкинов IL-1 β и IL-2

Объектом исследования служили брыжеечные ЛУ быка, спонтанная фазная сократительная активность регистрировалась в 29 полосках капсулы ЛУ (из 32). Для исследования использовали только препараты, обладающие спонтанной активностью. После установления стабильных параметров сокращения, в камеру вводили физиологический раствор с IL-1 β или IL-2 и на протяжении 30 минут регистрировали сократительную деятельность препаратов.

Исследования проводились по аналогии с ЛС. На интактные препараты ЛУ IL-1 β в концентрациях ниже 10^{-12} М не оказывал статистически значимых эффектов, а в концентрациях выше 10^{-10} М приводил к подавлению фазной сократительной активности ЛУ и снижению тонуса (Рисунок 4.4).

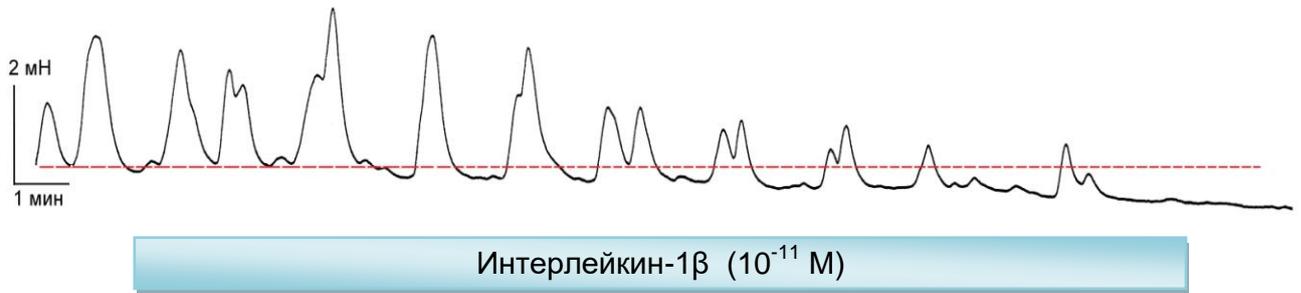


Рисунок 4.4 – Действие интерлейкина-1β на параметры сократительной активности капсулы лимфатического узла

Примечание. Пунктирной линией обозначен исходный тонус препарата.

IL-1β приводил к снижению всех показателей сократительной деятельности полосок капсулы ЛУ. Увеличение концентрации IL-1β в промежутке от 10^{-12} М до 10^{-10} М приводило к возрастанию ингибиторного эффекта на ГМК ЛУ. На Рисунке 4.5 представлены усредненные данные, изменения тонуса, амплитуды и частоты фазных сокращений ЛУ при действии интерлейкинов.

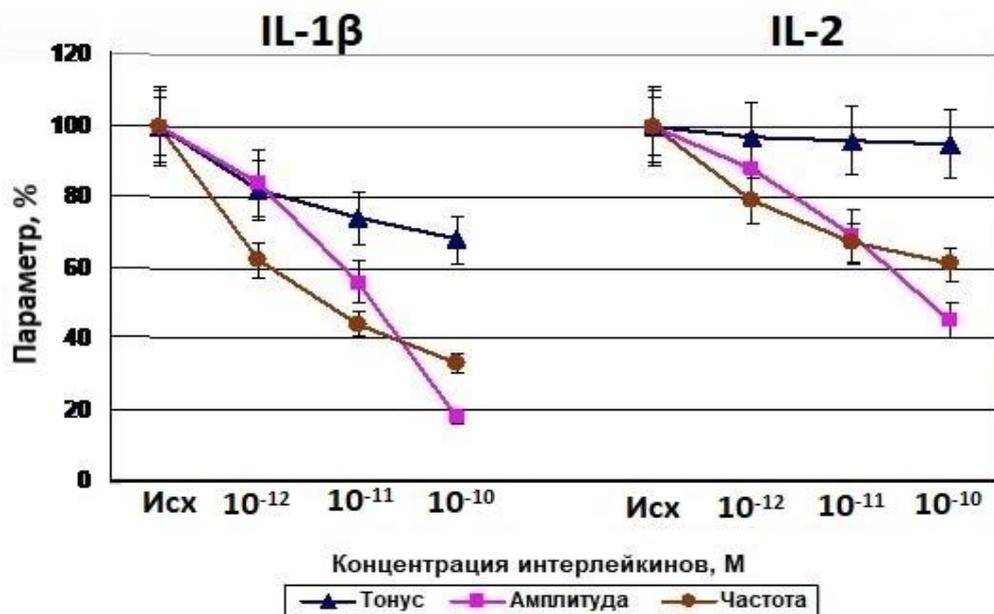


Рисунок 4.5 – Эффекты интерлейкина-1 β (IL-1 β) и интерлейкина-2 (IL-2) на параметры сократительной активности капсулы лимфатических узлов

Примечание. По оси абсцисс – концентрации IL-1 β и IL-2, по оси ординат – тонус, амплитуда и частота фазных сокращений (в % от исходных).

IL-1 β обладал ингибиторным эффектом на интактные препараты ЛУ, тормозное влияние предотвращалось при предварительном введении в физиологический раствор анакирины (антагониста рецепторов интерлейкина-1 β).

Нами были выявлены существенные отличия реакций деэндотелизированных препаратов ЛУ на IL-1 β по сравнению с интактными. Применение IL-1 β в концентрации 10^{-12} М на деэндотелизированные препараты сопровождалось статистически недостоверными изменениями параметров сократительной активности препаратов. В экспериментах с применением IL-1 β в концентрации 10^{-11} М наблюдалось незначительное снижение тонуса, амплитуды и частоты фазных сокращений (на $9,2 \pm 1,64\%$, $7,4 \pm 1,58\%$, $11,5 \pm 2,47\%$ соответственно).

На интактные препараты ингибиторный эффект IL-2 по сравнению с IL-1 β был менее выраженным. Введение IL-2 приводило к повышению тонуса ГМК капсулы ЛУ. Эффекты IL-2 на амплитуду и тонус фазных сокращений были слабо выраженным.

IL-2 в низких концентрациях не приводил к достоверным изменениям сократительной активности капсулы ЛУ. Воздействие IL-2 в концентрации 10^{-11} М на протяжении 10-15 минут приводило к медленному повышению тонуса ГМК капсулы ЛУ. Непрерывный проток раствора с IL-2 на протяжении 1 часа сопровождался сохранением повышенного тонуса препаратов на $+19,7 \pm 1,74\%$ по отношению к исходному. Возвращение к исходному уровню тонуса происходило

через 20-25 минут после удаления из раствора IL-2. При повышении концентрации IL-2 до 10^{-10} М наблюдалось дополнительное повышение тонуса ЛУ.

Действие IL-2 10^{-11} М на деэндотелизированные полоски капсулы лимфатических узлов сопровождалось выраженным повышением тонуса ГМК, в среднем на $24,2 \pm 3,77\%$ по отношению к исходному, амплитуда и частота фазных сокращений изменялись незначительно (Рисунок 4.6).

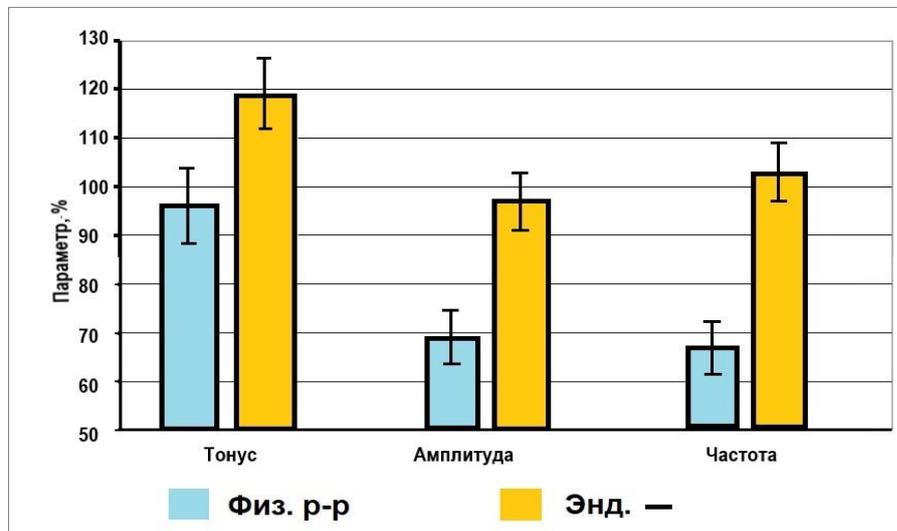


Рисунок 4.6 – Эффекты интерлейкина-2 на параметры сократительной активности капсулы лимфатических узлов

Примечание. Физ. р-р - параметр при действии IL-2 в физиологическом растворе, Энд (-) – параметр при действии IL-2 на деэндотелизированные полоски капсулы ЛУ.

4.4. Механизмы действия интерлейкинов IL-1 β и IL-2 на сократительную функцию лимфатических узлов

Имеются данные о том, что интерлейкины могут действовать только на клетки-мишени, которые экспрессируют для них рецепторы. Часто экспрессия таких рецепторов, как и сама продукция интерлейкинов, активно регулируется, поэтому покоящиеся клетки либо не экспрессируют данный рецептор, либо экспрессируют версию этого рецептора с низкой или малой аффинностью.

В лабораторных условиях стандартным способом оценки функциональной активности эндотелия является применение некоторых агонистов, воздействующих на рецепторы на эндотелиальных клетках. Из работ по изучению функции эндотелия артерий известно, что активация рецепторов на мембране эндотелиальных клеток приводит к запуску внутриклеточных сигнальных каскадов, обеспечивающих увеличение внутриклеточной концентрации ионов кальция ($[Ca^{2+}]_i$), фосфорилированию сигнальных белков и продукции вазодилаторных факторов (NO, EDHF, простаглицлин). Кроме того, имеются данные о том, что эндотелиальные клетки могут опосредованно активироваться в отсутствие прямых стимулов [83]. Индуцированная агонистом активация рецепторов на ГМК вызывает рост $[Ca^{2+}]_i$ и инозитолтрифосфата (IP3), которые могут обеспечивать передачу Ca^{2+} -сигнала в эндотелиальные клетки через миоэндотелиальные щелевые контакты [83, 278]. Стимуляция рецепторов ГМК в артериях приводит к зависимой от IP3 активации неселективных катионных каналов (подтип TRPV4) в эндотелиальных клетках, что обеспечивает вход Ca^{2+} и активацию путей эндотелий-зависимого расслабления [266].

В наших экспериментах было выявлено, что в целом реакции деэндотелизированных полосок капсулы ЛУ на оба интерлейкина значительно

отличались от реакций препаратов с интактным слоем эндотелиоцитов, что легло в основу изучения механизмов действия интерлейкинов.

Исследования были проведены на интактных препаратах, предварительно сокращенных норадреналином (5×10^{-6} М/л). Норадреналин значительно повышал тонус ЛУ, при этом фазные сокращения прекращались. Соответственно, анализировался только один параметр – величина тонического напряжения препаратов. За 15 минут до добавления в физиологический раствор IL-1 β вводили один из ингибиторов или блокаторов (L-NAME, индометацин, апамин, харибдотоксин).

Было установлено, что предварительная блокада эндотелиальной синтазы NO L-NAME приводила к существенному снижению ингибиторного эффекта IL-1 β . После L-NAME и восстановления тонуса в раствор вводили индометацин, приводящий к подавлению синтеза простагличина. Последующее добавление в раствор IL-1 β сопровождалась незначительным снижением тонуса ЛУ. Предварительное введение в раствор апамина и харибдотоксина снижало ингибирующий эффект IL-1 β в ЛУ (Рисунок 4.7).

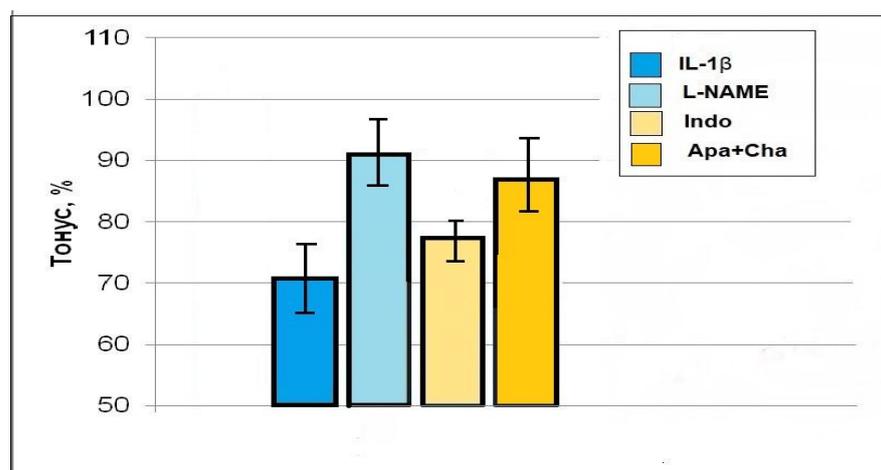


Рисунок 4.7 – Тонус лимфатических узлов при действии интерлейкина-1 β (10^{-11} М) на предварительно сокращенные норадреналином препараты

Примечание. 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, Ara+ Cha - тонус при действии IL-1 β на фоне апамина и харибдотоксина (в % от величины тонуса в физиологическом растворе с норадреналином).

Деэндотелизированные капсулы лимфатических узлов практически не реагировали на введение в раствор IL-1 β . Максимальные концентрации IL-1 β приводили к незначительному снижению тонуса гладкомышечных клеток. Эти данные позволили нам предположить, что ингибиторный эффект IL-1 β в лимфатических узлах реализуется посредством активации продукции эндотелиоцитами вазодилататоров.

Тормозный эффект IL-1 β на интактные препараты предотвращался при предварительном добавлении в физиологический раствор антагониста рецепторов интерлейкина-1 β – анакинры. Предварительная блокада эндотелиальной синтазы NO L-NAME приводила к существенному снижению тормозного эффекта IL-1 β . Ингибирование синтеза простаглицлина индометацином сопровождалась незначительными изменениями реакций ГМК капсулы лимфатических узлов на IL-1 β (Рисунок 4.8).

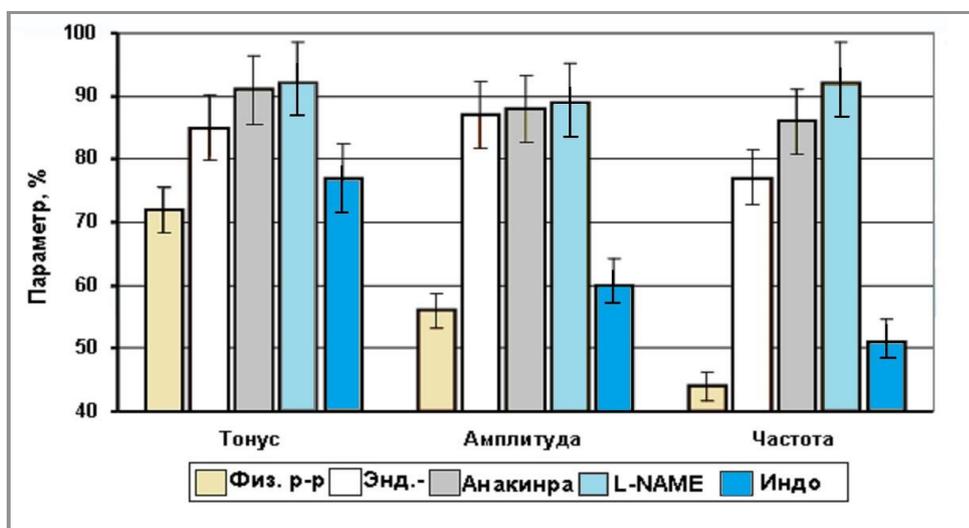


Рисунок 4.8 – Эффекты иетерлейкина-1 β (10^{-11} М) на параметры сократительной активности капсулы лимфатических узлов

Примечание. Физ. р-р - в физиологическом растворе, Энд (-) – деэндотелизированные полоски, Анакинра - на фоне действия антагониста рецепторов IL-1 β , L-NAME - на фоне действия ингибитора синтазы NO, Индо - на фоне действия индометацина (в % от исходных).

Полученные данные дали нам основание сделать заключение о механизме ингибиторного эффекта IL-1 β на сократительную активность ГМК ЛУ. IL-1 β связывается преимущественно с рецепторами на мембране эндотелиальных клеток синусов ЛУ. Комплекс IL-1 β – рецептор стимулирует в эндотелиоцитах конститутивную синтазу NO. Увеличение продукции NO сопровождается снижением всех параметров сократительной активности ГМК капсулы лимфатических сосудов. Роль простаноидов в развитии ингибиторного эффекта IL-1 β значительно меньше. На мембране гладкомышечных клеток капсулы лимфатических узлов мало рецепторов к IL-1 β и они не играют значимой роли в реакции лимфатических узлов на IL-1 β .

Учитывая данные о том, что IL-2 стимулирует в клетках фосфоинозитидный механизм [203], мы провели опыты с блокированием этого сигнального пути – LY-294002. На фоне блокады фосфоинозитид-3-киназы IL-2 приводил к достоверному снижению тонуса, а также амплитуды и частоты фазных сокращений ГМК интактных капсул лимфатических узлов и практически не оказывал влияния на амплитуду и частоту фазных сокращений ГМК деэндотелизированных капсул.

На фоне блокады эндотелиальной синтазы NO L-NAME IL-2 вызывал меньшее повышение тонического напряжения интактных препаратов по сравнению с деэндотелизированными, в то же время изменения амплитуды и

частоты фазных сокращений практически не отличались от соответствующих изменений в дезндотелизированных препаратах.

Применение ингибитора циклоксигеназы – индометацина не приводило к достоверным изменениям параметров сократительной активности ГМК интактных капсул лимфатических узлов (Рисунок 4.9).

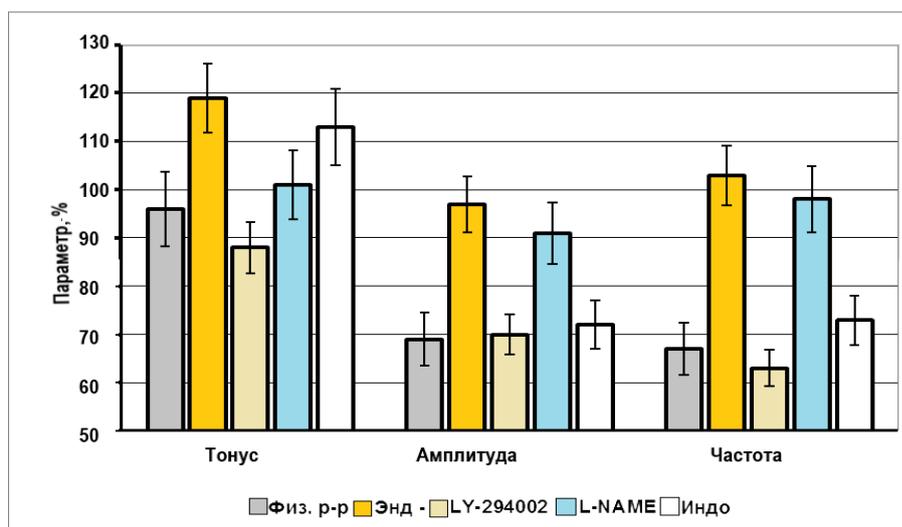


Рисунок 4.9 – Эффекты интерлейкина-2 (10^{-11} М) на параметры сократительной активности капсулы лимфатических узлов

Примечание. Физ. р-р - в физиологическом растворе, Энд (-) – дезндотелизированные полоски, LY-294002 - на фоне действия ингибитора фосфатидилинозитол-3-киназы, L-NAME - на фоне действия ингибитора синтазы NO, Индо - на фоне действия индометацина (в % от исходных).

4.5. Резюме

Исследования проводились на полосках капсулы ЛУ и кольцах ЛС. Установлено, что эффекты интерлейкинов IL-1 β и IL-2 запускаются через мембранные рецепторы.

Эффект IL-1 β является эндотелий-зависимым. После связывания IL-1 β с рецептором в эндотелиальных клетках увеличивается продукция NO. Действие NO на ГМК лимфатических сосудов и узлов приводит к снижению амплитуды и частоты фазных сокращений на фоне выраженного снижения тонуса.

Механизмы действия IL-2 на лимфатические узлы являются более сложными. Рецепторы к IL-2 имеются как на эндотелиоцитах, так и на ГМК. Комплекс IL-2-рецептор на ГМК запускает в них фосфоинозитидный механизм, что приводит к повышению тонуса миоцитов. В то же время комплекс IL-2-рецептор на эндотелиоцитах стимулирует продукцию NO, который способствует снижению тонуса и уменьшению амплитуды и частоты спонтанных фазных сокращений. В итоге при действии IL-2 амплитуда и частота фазных сокращений лимфатических сосудов и узлов снижаются при практически неизменном уровне тонуса.

ГЛАВА 5

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

Воспалительный процесс (инфекционной и неинфекционной этиологии) является стрессовым фактором для организма и сопровождается повышенным выбросом в кровь ГК, которые оказывают сложное влияние на ткани. На начальном этапе патологического процесса ГК оказывают выраженный провоспалительный эффект, приводящий к активации врожденного иммунитета и стимуляции воспаления [139]. На стадии разрешения воспаления провоспалительный эффект ГК сменяется противовоспалительным с целью подавления адаптивного иммунитета и восстановления гомеостаза ткани [95].

В клинической практике используется преимущественно способность ГК ингибировать воспаление, они широко применяются для лечения различных патологических состояний, таких как аллергические, аутоиммунные и воспалительные [258]. В высоких терапевтических концентрациях ГК оказывают мощный противовоспалительный и иммуносупрессорный эффект. ГК угнетают пролиферацию иммунокомпетентных клеток, а также вызывают апоптоз Т-лимфоцитов [36]. Полагают, что иммуносупрессорный эффект ГК обусловлен подавлением синтеза интерлейкинов IL-1 и IL-2. Кроме этого, известно, что ГК способны угнетать также синтез других провоспалительных факторов.

ГК оказывают свое иммуносупрессивное действие за счёт взаимодействия со специфическими плазматическими рецепторами лимфоцитов (геномным и негеномным путем). В первом случае, комплекс ГК-рецептор, мигрируя в ядро, непосредственно взаимодействует с ДНК, угнетая экспрессию провоспалительных генов или активируя синтез факторов с противовоспалительной активностью. Во втором — происходит связывание ГК с нуклеарным фактором

кВ, содержащимся в цитоплазме, и угнетение его провоспалительного действия. Под влиянием терапии ГК уменьшается пролиферативная активность лимфоцитов и снижается синтез антител, то есть иммуносупрессия является неселективной. Неселективная иммуносупрессия реализуется также за счет супрессивного эффекта на макрофагальное звено; угнетения пролиферации и функциональной активности Т-лимфоцитов (преобладающее действие на Т-хелперы 2 типа); угнетения пролиферации В-лимфоцитов и антителогенеза; снижения уровня циркулирующих антител; тимолитического эффекта. ГК могут также непосредственно влиять на синаптическую передачу путем усиления кальциевого тока через пресинаптическую мембрану при ее деполяризации; потенциации эффектов симпато-адреналовой системы; субстратного обеспечения синаптической передачи; задержки ресинтеза Н-холинорецепторов, снижение чувствительности постсинаптической мембраны.

Глюкокортикоидные рецепторы выражены практически во всех тканях, включая органы лимфатической системы, в т.ч. и структуры, обеспечивающие транспорт лимфы. Поскольку в литературе практически нет данных о действии ГК на сократительную активность ЛС и ЛУ, лежащую в основе их транспортной функции, изучение их эффектов и механизмов действия представляется важным не только для фундаментальной медицины, но и для клинической практики.

5.1. Негеномные эффекты глюкокортикоидов на лимфатические сосуды и узлы

5.1.1. Сократительная функция лимфатических сосудов при действии глюкокортикоидов

ЛС в физиологическом растворе имели стабильный уровень тонуса и обладали спонтанной фазной сократительной активностью. На фоне стабильной

сократительной активности в раствор вводили гидрокортизон в концентрации 1 мг/л или дексаметазон в концентрации 0,04 мг/л (в клинике такие концентрации принято считать низкими терапевтическими дозами) [144]. При введении ГК наблюдалось повышение тонуса ЛС, возрастала частота и снижалась амплитуда их фазных сокращений. При повышении концентрации ГК в 10 раз (гидрокортизона до 10 мг/л, дексаметазона до 0,4 мг/л – высокие терапевтические дозы [144]) изменения сократительной активности ЛС были более выраженными (Рисунок 5.1). К 7-10 минутам действия ГК параметры сократительной деятельности ЛС устанавливались на новом, относительно стабильном, уровне (Таблица 5.1).

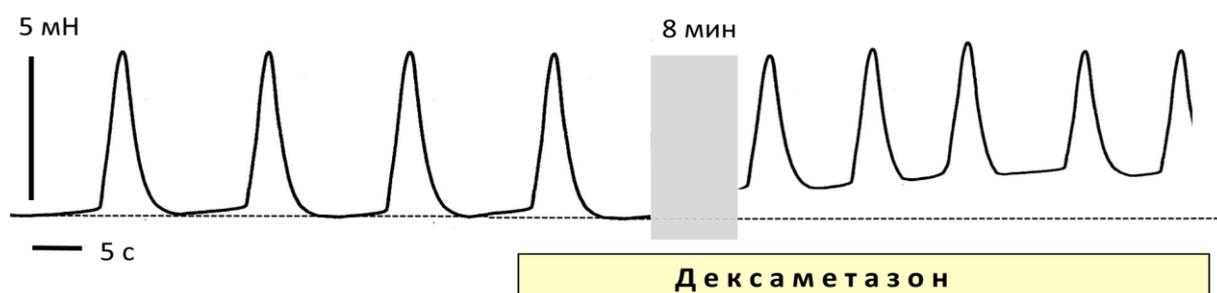


Рисунок 5.1 – Сократительная активность ЛС при действии дексаметазона (0,4 мг/л)

Примечание. Пунктирная линия показывает исходный уровень тонуса препарата. Разрыв на кривой соответствует интервалу времени 8 мин.

Поскольку в низких концентрациях стимулирующие эффекты гидрокортизона и дексаметазона были слабо выраженными и с учетом того, что их эффекты в эквивалентных концентрациях практически не отличались, дальнейшие исследования проводились с применением только одного ГК – дексаметазона в терапевтически высокой концентрации 0,4 мг/л.

Таблица 5.1 – Параметры сократительной активности лимфатических сосудов при действии гидрокортизона и дексаметазона

Параметр	Гидрокортизон 1 мг/л	Гидрокортизон 10 мг/л	Дексаметазон 0,04 мг/л	Дексаметазон 0,4 мг/л
Тонус	113±7,6*	127±9,1*	115±6,7*	134±10,7*
Амплитуда	92±5,7	81±7,8*	91±5,2*	79±7,1*
Частота	112±6,9*	129±8,8*	116±7,4*	139±11,6*

Примечание. Данные представлены в % по отношению к параметрам, зарегистрированным в физиологическом растворе. Изменения параметров достоверны, * - $p < 0,05$.

5.1.2. Механизмы действия глюкокортикоидов на сократительную функцию лимфатических сосудов

Для оценки возможного участия эндотелиальных клеток в реализации эффектов ГК часть ЛС дезэндотелизировали. Дезэндотелизированные сегменты ЛС в стандартных экспериментальных условиях имели повышенный уровень тонуса и более высокую частоту фазных сокращений по сравнению с интактными. Дексаметазон в концентрации 0,4 мг/л на дезэндотелизированные препараты оказывал меньший стимулирующий эффект по сравнению с его действием на интактные (Таблица 5.2).

Меньшие по амплитуде и частоте реакции дезэндотелизированных ЛС при действии дексаметазона по сравнению с аналогичными реакциями интактных ЛС дали нам основание предположить, что реакции ЛС на ГК являются эндотелий-зависимыми. С целью определения роли различных эндотелиальных вазодилататоров в реализации стимулирующего эффекта дексаметазона на ЛС были проведены три серии опытов с ингибированием синтазы NO и

циклооксигеназы и блокадой Ca^{2+} -чувствительных K^+ -каналов большой и промежуточной проводимости.

Таблица 5.2 – Параметры сократительной активности дезэндотелизированных лимфатических сосудов при действии дексаметазона 0,4 мг/л

Параметр	Дексаметазон (интактные препараты)	Дезэндотели- зированные препараты	Дексаметазон (дезэндотелизированные препараты)
Тонус	134±10,7*	121±7,2*	138±9,6*
Амплитуда	79±7,1*	87±6,4*	78±5,2*
Частота	139±9,6*	121±9,3*	142±10,4*

Примечание. Данные представлены в % по отношению к параметрам, зарегистрированным при исследовании интактных препаратов в физиологическом растворе: * – достоверно по отношению к исходным параметрам интактных препаратов ($p < 0,05$).

При исследовании роли NO в раствор предварительно добавляли ингибитор синтазы NO – L-NAME. Действие L-NAME сопровождалось повышением тонуса и возрастанием частоты фазных сокращений ЛС. Через 15 минут на фоне действия L-NAME в раствор вводили дексаметазон, который в этом случае оказывал меньший стимулирующий эффект на ЛС по сравнению с его эффектом в физиологическом растворе (Рисунок 5.2).

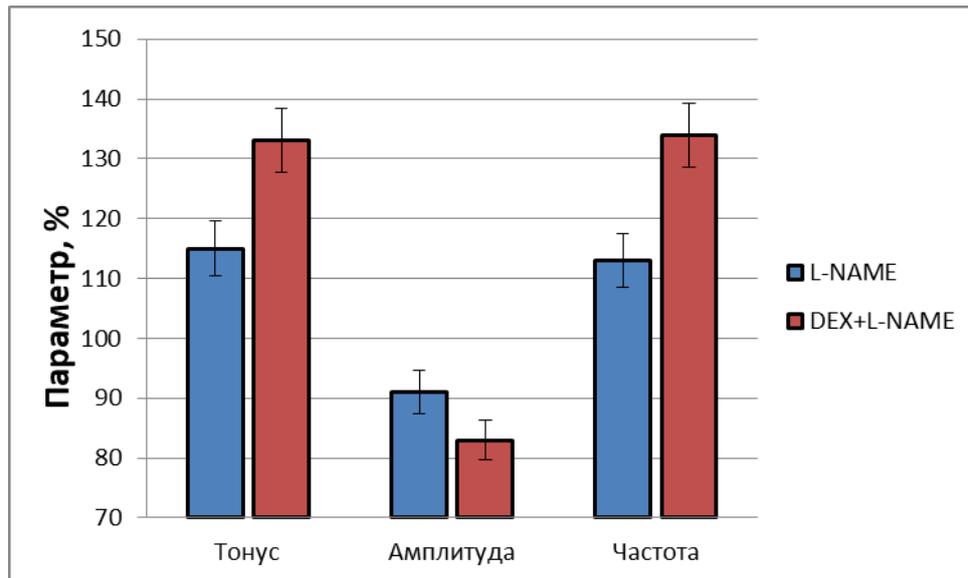


Рисунок 5.2 – Действие дексаметазона (DEX) на сократительную активность лимфатических сосудов на фоне ингибитора синтазы NO (L-NAME)

Примечание. 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-NAME достоверны, $p < 0,05$.

Исследование роли простаглицина в реализации эффектов дексаметазона на ЛС проводилось по такой же схеме. Циклооксигеназу ингибировали индометацином. Действие индометацина сопровождалось небольшим повышением тонуса и возрастанием частоты фазных сокращений. Через 15 минут на фоне действия индометацина в раствор вводили дексаметазон, который в этом случае оказывал несколько меньший стимулирующий эффект на ЛС по сравнению с его эффектом в физиологическом растворе (Рисунок 5.3).

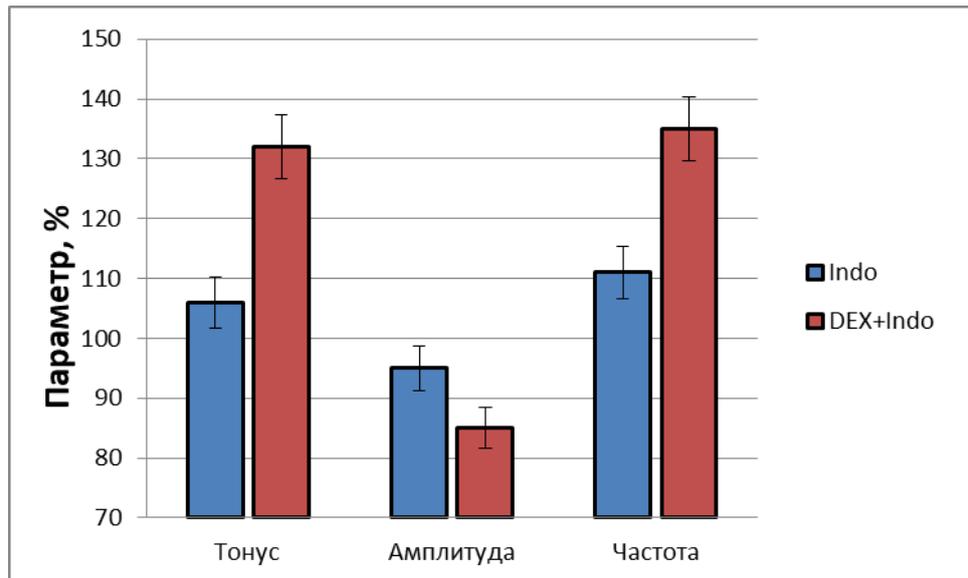


Рисунок 5.3 – Действие дексаметазона (DEX) на сократительную активность лимфатических сосудов на фоне ингибитора ингибитора циклооксигеназы – индометацина (Indo)

Примечание. 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 индометацина достоверны, $p < 0,05$.

В серии опытов с применением дексаметазона на фоне тетраэтиламмония (блокатора Ca^{2+} -чувствительных K^+ -каналов большой проводимости) и харибдотоксина (блокатора Ca^{2+} -чувствительных K^+ -каналов промежуточной проводимости) мы не обнаружили достоверных изменений параметров сократительной активности по сравнению с таковыми при применении дексаметазона в физиологическом растворе.

Совместное применение L-NAME и индометацина уменьшало стимулирующий эффект дексаметазона на ЛС, но не отменяло его. Ранее при исследовании эффектов ГК на величину АД у септических животных было установлено, что ГК усиливают эффект симпатических нервов на

гладкомышечные клетки артерий и способствуют повышению артериального давления. Авторы этой работы полагают, что подобный эффект ГК был обусловлен торможением обратного захвата норадреналина в нервные окончания [182]. С учетом вышеизложенного мы исследовали эндотелий-независимые реакции ЛС на дексаметазон - изучили роль норадреналина и α -адренорецепторов в реализации стимулирующего эффекта дексаметазона на ЛС. На первом этапе было проведено исследование эффектов дексаметазона на деэндотелизированные ЛС на фоне норадреналина. После установления стабильных параметров сократительной активности ЛС в раствор вводили норадреналин (1×10^{-6} М/л). Норадреналин оказывал стимулирующее действие на деэндотелизированные ЛС, приводя к повышению их тонуса, увеличению частоты и снижению амплитуды фазных сокращений. На фоне норадреналина дексаметазон оказывал значительно меньший стимулирующий эффект по сравнению с его эффектом в физиологическом растворе (Рисунок 5.4).

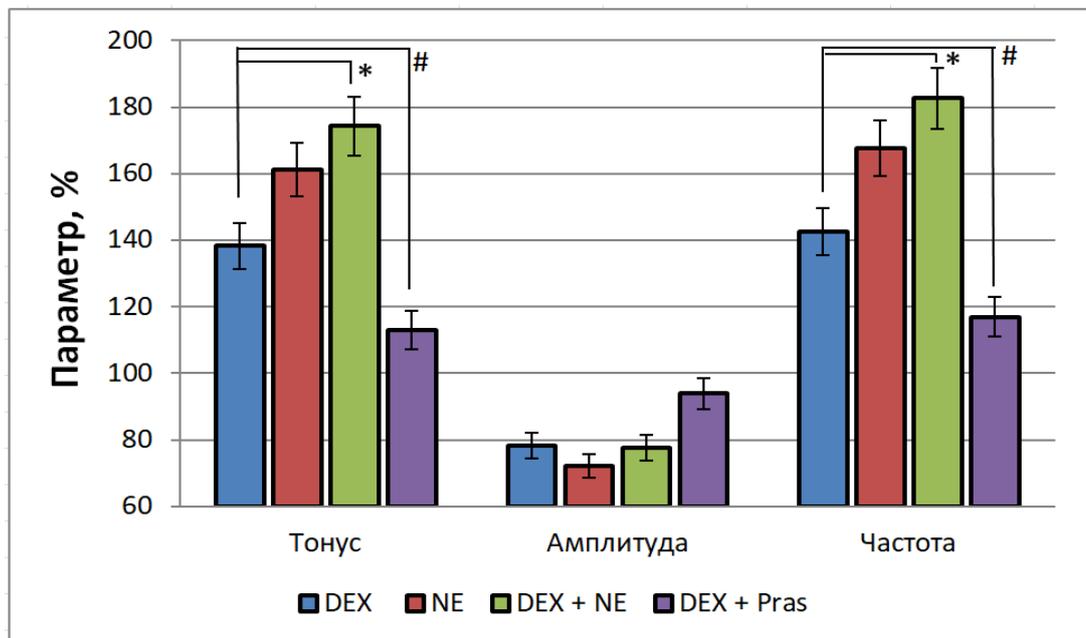


Рисунок 5.4 – Параметры сократительной активности деэндотелизированных лимфатических сосудов при действии дексаметазона (DEX) на фоне норадреналина (NE) и празозина (Pras)

Примечание. Тонус, амплитуда и частота фазных сокращений ЛС представлены в % по отношению к их величинам, зарегистрированным на интактных препаратах в физиологическом растворе. Изменения параметров достоверны: * - $p < 0,01$; # - $p < 0,05$.

Помимо применения дексаметазона на фоне действия норадреналина, мы провели аналогичные исследования на фоне блокады α -адренорецепторов селективным блокатором – празозином. Результаты этой серии экспериментов также представлены на Рисунке 5.4. На фоне празозина стимулирующий эффект дексаметазона на сократительную активность ЛС был значительно меньшим по сравнению с его эффектом в физиологическом растворе.

Поскольку в вышеописанных опытах стимулирующий эффект дексаметазона на фоне блокады альфа-адренорецепторов уменьшался, но не отменялся, оставался открытым вопрос о механизме этого эффекта. Ранее в опытах на препаратах кровеносных сосудов крыс было показано, что дексаметазон стимулирует норадреналин-индуцированное сокращение гладких мышц посредством активации RhoA / RhoA киназы [116]. Учитывая эти данные, мы провели исследование 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 (повышение тонуса составило $84,6 \pm 5,5\%$ от такового в растворе без Y-27632, а увеличение частоты фазных сокращений – $77,4 \pm 6,1\%$ от таковой в растворе без Y-27632).

5.1.3. Сократительная функция лимфатических узлов при действии глюкокортикоидов

В полосках капсулы ЛУ при физиологических величинах напряжения на протяжении 25-30 минут устанавливался стабильный уровень тонуса, на фоне которого регистрировались регулярные фазные сокращения. Добавление в раствор гидрокортизона (1 мг/л) или дексаметазона (0,04 мг/л) приводило к изменению параметров сократительной активности ЛУ: тонус препаратов возрастал, увеличивалась частота фазных сокращений с одновременным уменьшением их амплитуды. Указанные изменения были менее выраженными по сравнению с ЛС. При повышении концентрации гидрокортизона до 10 мг/л, а дексаметазона до 0,4 мг/л, изменения сократительной активности ЛУ становились более выраженными и статистически достоверными. К 12-15 минутам действия ГК параметры сократительной деятельности ЛУ устанавливались на новом уровне (Рисунок 5.5 и Таблица 5.3).

Дальнейшие исследования ЛУ проводились по аналогии с ЛС с применением только дексаметазона в концентрации (0,4 мг/л).

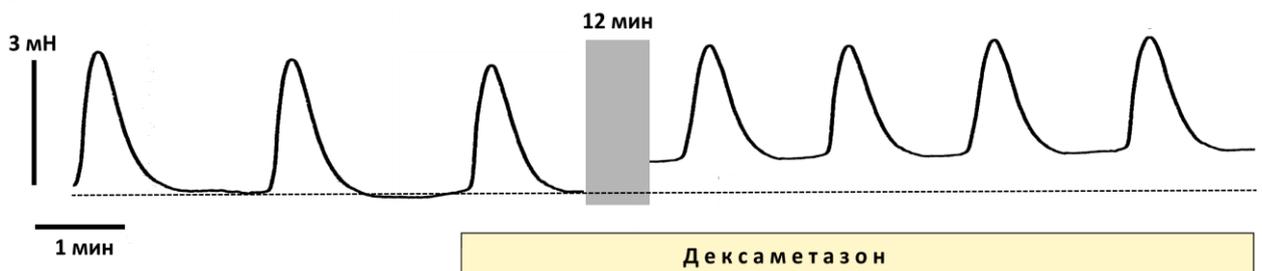


Рисунок 5.5 – Сократительная активность ЛУ при действии дексаметазона (0,4 мг/л)

Примечание. Пунктирная линия показывает исходный уровень тонуса препарата. Разрыв на кривой соответствует интервалу времени 12 минут.

Таблица 5.3 – Параметры сократительной активности лимфатических узлов при действии гидрокортизона и дексаметазона

Параметр	Гидрокортизон 1 мг/л	Гидрокортизон 10 мг/л	Дексаметазон 0,04 мг/л	Дексаметазон 0,4 мг/л
Тонус	108±7,2	121±8,4*	110±8,8	125±8,6*
Амплитуда	95±6,6	86±5,9*	96±6,2	84±6,1*
Частота	107±6,1	123±9,0*	109±7,7	131±9,2*

Примечание. Данные представлены в % по отношению к параметрам, зарегистрированным в физиологическом растворе. * - $p < 0,05$.

5.1.4. Механизмы действия глюкокортикоидов на сократительную функцию лимфатических узлов

Для оценки возможного участия литоральных (эндотелиальных) клеток субкапсулярного синуса в реализации эффектов ГК у 12 полосок ЛУ субкапсулярный синус удаляли (таким образом были получены деэндотелизированные полоски капсулы ЛУ). Деэндотелизированные полоски капсулы ЛУ в стандартных экспериментальных условиях демонстрировали более высокий тонус и повышенную частоту фазных сокращений по сравнению с интактными с одновременным снижением их амплитуды. Дексаметазон в концентрации 0,4 мг/л на деэндотелизированные препараты оказывал меньший стимулирующий эффект по сравнению с действием на интактные (Таблица 5.4).

Таблица 5.4 – Параметры сократительной активности деэндотелизированных полосок капсулы лимфатических узлов при действии дексаметазона 0,4 мг/л

Параметр	Дексаметазон (интактные препараты)	Деэндотели- зированные препараты	Дексаметазон (деэндотелизированные препараты)
Тонус	125±8,6*	116±8,1*	127±9,1*
Амплитуда	84±6,1*	94±6,2*	87±6,6*
Частота	131±9,2*	113±8,5*	136±9,3*

Примечание. Данные представлены в % по отношению к параметрам, зарегистрированным при исследовании интактных препаратов в физиологическом растворе: * – достоверно по отношению к исходным параметрам интактных препаратов ($p < 0,05$).

На основании меньших по величине реакций деэндотелизированных полосок капсулы ЛУ при действии дексаметазона по сравнению с аналогичными реакциями интактных ЛУ нами было сделано предположение о том, что реакции ЛУ на ГК являются эндотелий-зависимыми. Поэтому с целью определения возможной роли различных эндотелиальных вазодилататоров в реализации стимулирующего эффекта дексаметазона на ЛУ были проведены три серии опытов с ингибированием синтазы NO и циклооксигеназы и блокадой Ca^{2+} -чувствительных K^+ -каналов большой и промежуточной проводимости.

Для определения роли NO в стимуляции сократительной активности ЛУ при действии дексаметазона в раствор предварительно добавляли ингибитор синтазы NO – L-NAME. На фоне L-NAME тонус ЛУ повышался, несколько возрастала частота и снижалась амплитуда фазных сокращений. Через 15 минут на фоне действия L-NAME в раствор вводили дексаметазон, который в этом случае оказывал меньший стимулирующий эффект на ЛУ по сравнению с его эффектом в физиологическом растворе (Рисунок 5.6).

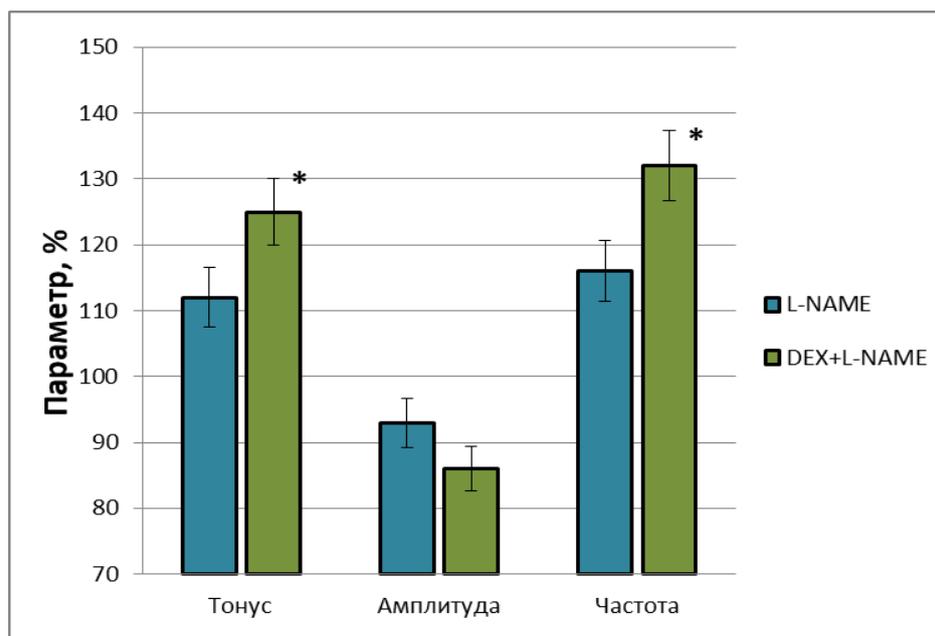


Рисунок 5.6 – Действие дексаметазона (DEX) на сократительную активность лимфатических узлов на фоне L-NAME

Примечание. Тонус, амплитуда и частота фазных сокращений представлены в % по отношению к их величинам, зарегистрированным на интактных препаратах в физиологическом растворе. * - изменения достоверны, $p < 0,05$.

В лимфатической системе простаглицлин принимает участие в регуляции сократительной активности ГМК ЛС и ЛУ. С целью определения участия простаглицлина в дексаметазон-индуцированной стимуляции сократительной активности ЛУ применяли индометацин, являющийся ингибитором циклооксигеназы. После 15-минутного воздействия индометацина в раствор вводили дексаметазон. На фоне индометацина дексаметазон оказывал меньший стимулирующий эффект на ЛУ по сравнению с его эффектом в физиологическом растворе (Рисунок 5.7).

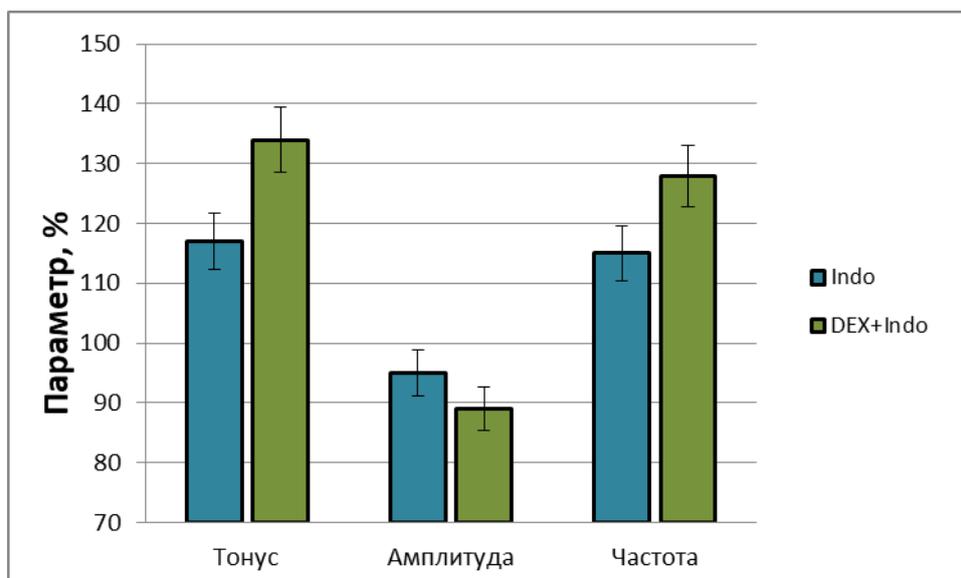


Рисунок 5.7 – Параметры сократительной активности лимфатических узлов на фоне индометацина (Indo)

Примечание. Тонус, амплитуда и частота фазных сокращений представлены в % по отношению к их величинам, зарегистрированным на интактных препаратах в физиологическом растворе. * - изменения достоверны, $p < 0,05$.

Тетраэтиламмония хлорид на фоне действия дексаметазона снижал величину тонуса и частоту фазных сокращений ЛУ и увеличивал амплитуду фазных сокращений (Рисунок 5.8). Изменения параметров сократительной активности были хотя и недостоверными, но хорошо выраженными. ТЭА не оказывал влияния на параметры сократительной активности дезнотелизированных препаратов капсулы ЛУ на фоне действия дексаметазона.

Харибдотоксин в аналогичных экспериментах не приводил к изменениям параметров сократительной активности ЛУ на фоне дексаметазона.

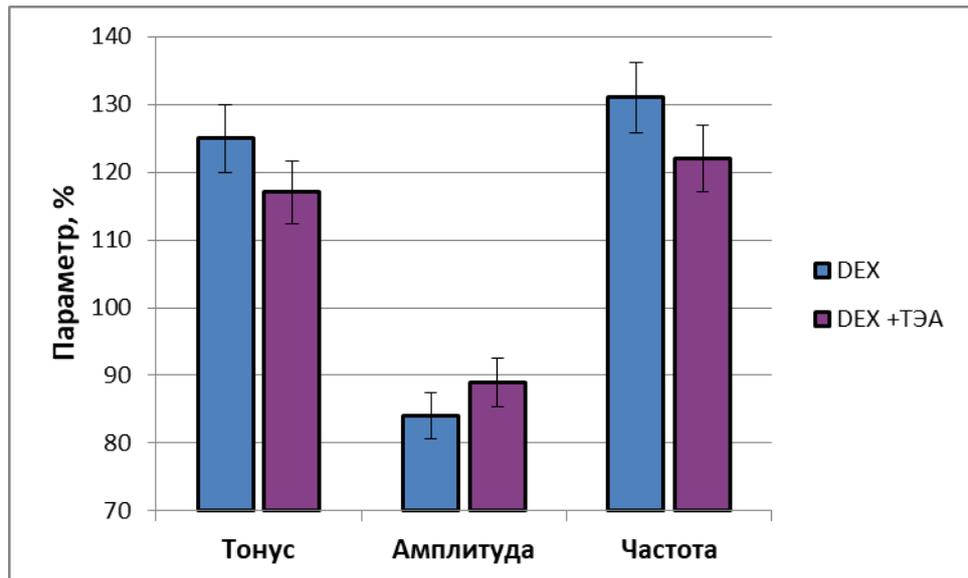


Рисунок 5.8 – Параметры сократительной активности лимфатических узлов при действии тетраэтиламмония (ТЭА) на фоне дексаметазона (DEX)

Примечание. Тонус, амплитуда и частота фазных сокращений представлены в % по отношению к их величинам, зарегистрированным на интактных препаратах в физиологическом растворе.

Совместное применение L-NAME, индометацина и ТЭА практически полностью нивелировало стимулирующий эффект дексаметазона на ЛУ. Параметры сократительной активности деэндотелизированных препаратов ЛУ при действии дексаметазона не претерпевали статистически значимых изменений.

5.2. Геномные эффекты глюкокортикоидов на лимфатические сосуды и узлы (исследования *in vitro*)

5.2.1. Влияние липополисахарида на сократительную функцию лимфатических сосудов

В данной серии исследований сегменты ЛС быка на протяжении 6 часов инкубировали в физиологическом растворе с ЛПС при температуре +37°C.

Препараты брыжеечных ЛС быка, обработанные ЛПС, демонстрировали низкий уровень тонуса, частота и амплитуда их фазных сокращений ЛС были существенно меньшими по сравнению с контрольными препаратами. В деэндотелизированных сегментах ЛС, инкубированных в растворе с ЛПС, также было зарегистрировано снижение тонуса, уменьшение частоты и амплитуды фазных сокращений, однако изменения параметров были меньшими по сравнению с интактными препаратами (Рисунок 5.9).

Параметры сократительной активности интактных препаратов ЛС, инкубированных в растворе с ЛПС и дексаметазоном, изменялись значительно меньше по сравнению с ЛС первой группы, а в деэндотелизированных ЛС изменения тонуса, частоты и амплитуды были незначительными по сравнению с деэндотелизированными ЛС первой группы (Рисунок 5.9).

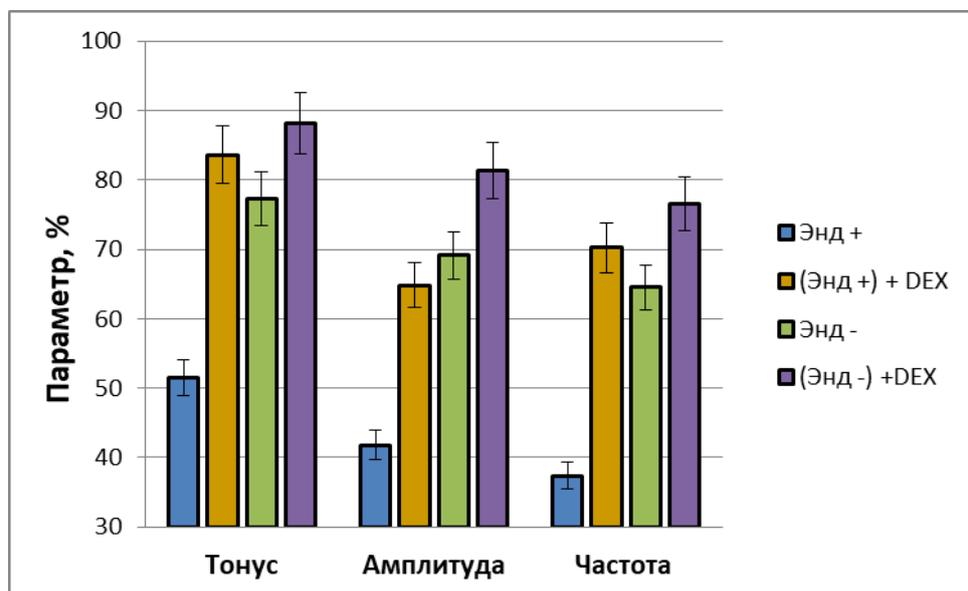


Рисунок 5.9 – Параметры сократительной активности брыжеечных лимфатических сосудов быка (интактных – Энд+ и деэндотелизированных – Энд) инкубированных в растворе с ЛПС и в растворе с ЛПС и десаметазоном

Полученные данные свидетельствуют о том, ЛПС оказывает ингибирующее действие как непосредственно на гладкомышечные клетки ЛС, так и опосредованно, через влияние на эндотелиоциты. Важным представляется и факт, что в растворе, содержащем ЛПС и дексаметазон, ингибирующий эффект ЛПС был менее выраженным.

Для раскрытия механизмов действия ЛПС на ЛС и протективного действия дексаметазона мы провели серию экспериментов с добавлением в раствор для инкубации, содержащий ЛПС, субстанции 1400W, являющейся селективным ингибитором iNOS. После инкубации 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 (Рисунок 5.10).

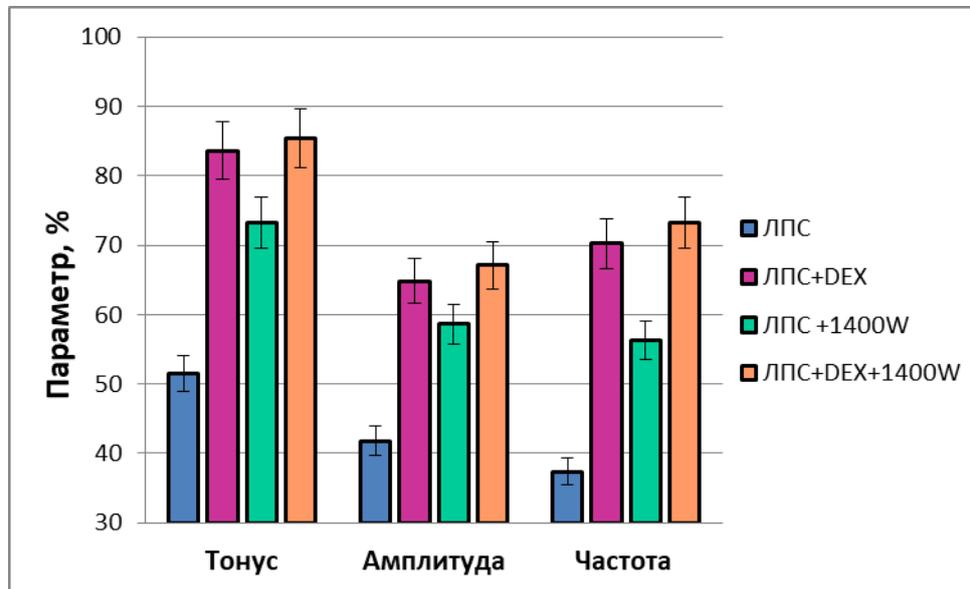


Рисунок 5.10 – Параметры сократительной активности лимфатических сосудов, инкубированных в растворах, содержащих ЛПС, ЛПС+1400W и ЛПС+1400W+дексаметазон

Следующая серия опытов была проведена по схеме, описанной в предыдущем абзаце, с применением селективного ингибитора циклооксигеназы-2 – династата. Инкубация ЛС в растворе, содержащем ЛПС + династат приводила к значительно меньшему ингибирующему эффекту по сравнению с эффектом ЛПС. Инкубация ЛС в растворе, содержащем ЛПС + династат + дексаметазон, сопровождалась еще меньшим ингибированием сократительной активности ЛС (Рисунок 5.11).

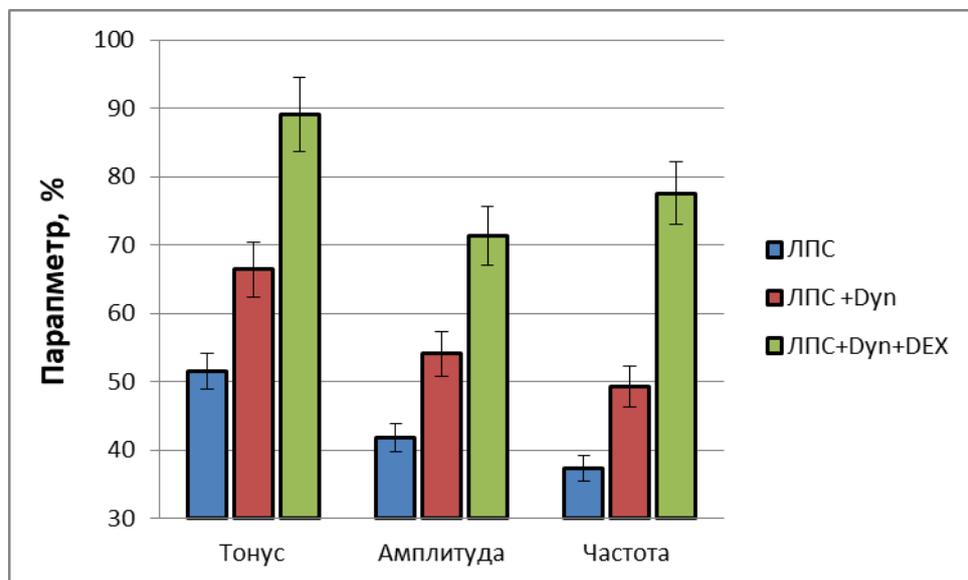


Рисунок 5.11 – Параметры сократительной активности лимфатических сосудов, инкубированных в растворах, содержащих ЛПС, ЛПС+династат и ЛПС+династат+дексаметазон

5.2.2. Влияние липополисахарида на сократительную функцию лимфатических узлов

Исследования ЛУ были проведены по схеме, аналогичной схеме исследования ЛС. Препараты ЛУ (интактные и деэндотелизированные) инкубировали в растворе, содержащем ЛПС. После инкубации в интактных ЛУ

фазная сократительная активность не регистрировалась, тонус был значительно снижен по сравнению с контролем (Таблица 5.5). В деэндотелизированных полосках капсулы ЛУ, инкубированных в растворе с ЛПС, также было зарегистрировано снижение тонуса, спонтанная фазная активность сохранялась. Наблюдалось уменьшение частоты и амплитуды фазных сокращений, однако изменения параметров были меньшими по сравнению с интактными препаратами.

Таблица 5.5 – Параметры сократительной активности брыжеечных ЛУ быка, инкубированных в растворе с липополисахаридом

Лимфатические узлы	Тонус	Фазные сокращения	
		Частота	Амплитуда
Энд +	66,7±3,9*	0	0
Энд -	79,2±4,8*	56,4±2,6*	51,1±4,3*

Примечание. Тонус, амплитуда и частота фазных сокращений представлены в % по отношению к аналогичным параметрам, зарегистрированным при исследовании интактных лимфатических узлов в физиологическом растворе. Энд+ - интактные препараты, Энд- - деэндотелизированные препараты. Достоверно, по отношению к соответствующему параметру в физиологическом растворе, * - $p < 0,01$.

Для раскрытия механизмов действия ЛПС на ЛУ и механизмов протективного действия дексаметазона была проведена серия опытов с добавлением в раствор для инкубации, содержащий ЛПС, селективного ингибитора iNOS - 1400W. На фоне действия 1400W ингибирующий эффект ЛПС на ЛУ был выражен значительно слабее. Спонтанная сократительная активность ЛУ сохранялась, ЛУ демонстрировали высокий уровень тонуса. В растворе,

содержащем 1400W и дексаметазон параметры сократительной активности ЛУ были еще выше (Рисунок 5.12).

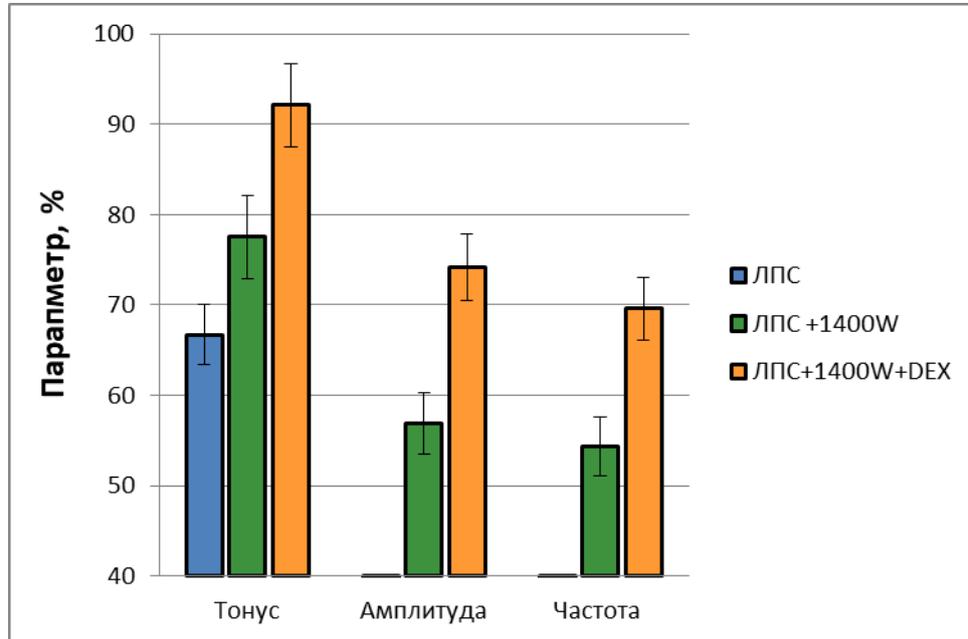


Рисунок 5.12 – Параметры сократительной активности лимфатических узлов, инкубированных в растворах, содержащих ЛПС, ЛПС+1400W и ЛПС+1400W+дексаметазон

Серия экспериментов, аналогичная описанной выше, была проведена с применением династата – селективного ингибитора индуцибельной циклооксигеназы. Результаты этой серии опытов представлены на Рис. 5.13. Инкубация ЛУ в растворе, содержащем ЛПС+династат, приводила к значительно меньшему ингибирующему эффекту по сравнению с эффектом ЛПС. Инкубация ЛУ в растворе, содержащем ЛПС+династат+дексаметазон, сопровождалась еще меньшим ингибированием сократительной активности ЛУ.

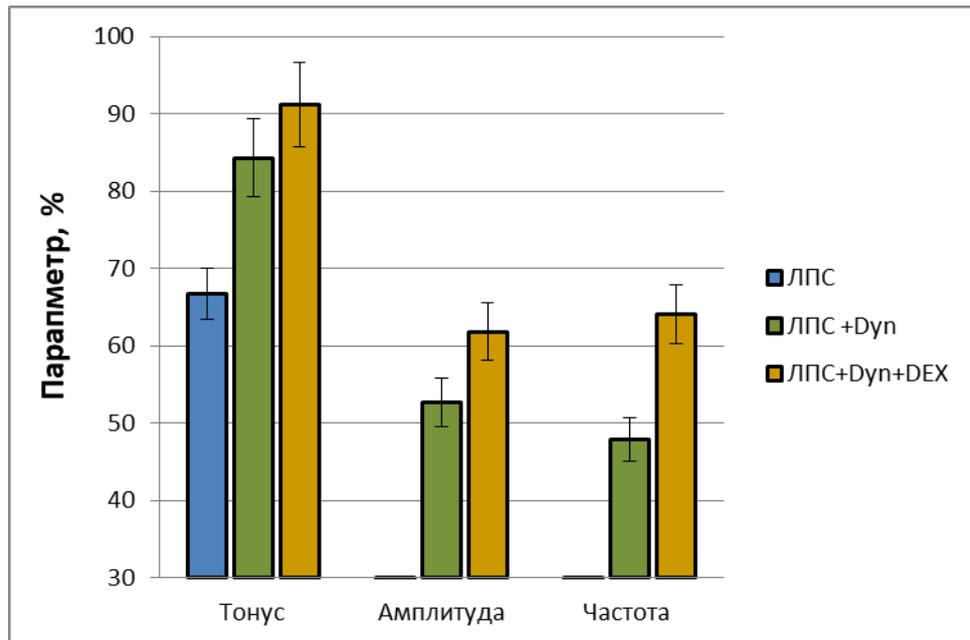


Рисунок 5.13 – Параметры сократительной активности лимфатических узлов, инкубированных в растворах, содержащих ЛПС, ЛПС+династат и ЛПС+династат+дексаметазон

5.3. Геномные эффекты глюкокортикоидов на лимфатические сосуды и узлы (исследования *in vivo*)

В данной серии опытов исследования проводились на брыжеечных ЛС (кишечный ствол) и ЛУ крысы, которым за сутки до забора препаратов проводили лигирование-перфорацию слепой кишки [139]. Первые клинические признаки развития сепсиса у крыс начинали проявляться через 6 часов после операции. Через 24 часа у всех животных с лигированием-перфорацией слепой кишки были выявлены явные признаки сепсиса: гиподинамия, взъерошенность шерсти, сгорбленное положение, диарея, низкое АД. После вскрытия у всех животных с лигированием-перфорацией слепой кишки были выявлены признаки перитонита: воспаленный отечный кишечник темного цвета, гнойный перитонеальный

экссудат, диффузное осаждение фибрина и множественные спайки. В спаечный процесс были вовлечены печень, селезенка, толстая кишка и сальник. Спаечный процесс по всей брюшной полости наблюдался реже. Стенка тонкого кишечника была гиперемирована, с выраженным венозным рисунком. Слепая кишка не раздута, с небольшим количеством каловых масс. Толстая кишка раздута умеренно, в просвете находилось жидкое содержимое.

Абдоминальный сепсис в экспериментальных условиях являлся следствием бактериального инфицирования брюшной полости, вызванного нарушением кишечного барьера, что в конечном итоге приводило к развитию системного воспалительного ответа с образованием большого количества различных биологически активных веществ, способных изменять сократительную функцию ЛС и ЛУ [84, 275].

5.3.1. Сократительная функция лимфатических сосудов у септических животных при действии глюкокортикоидов

Нами выявлено, что у животных с сепсисом имелось выраженное снижение тонуса ЛС по сравнению с контролем, фазные сокращения были более редкими и низкоамплитудными (Таблица 5.5). Максимальное угнетение сократительной активности ЛС наблюдалось у адреналэктомированных крыс с сепсисом. У интактных животных с сепсисом и адреналэктомированных, которым вводился дексаметазон, тонус, амплитуда и частота фазных сокращений были значительно выше.

Таблица 5.6 – Параметры сократительной активности кишечного ствола крыс

Параметры сократительной активности	Крысы с сепсисом	Крысы с сепсисом (адр -)	Крысы с сепсисом (адр -) + DEX)	Контроль
Тонус, мН	1,18±0,11**	0,74±0,09 [#]	1,31±0,08 ^{&}	1,66±0,13
Частота фазных сокращений, мин ⁻¹	3,60±0,28**	2,23±0,19 [#]	3,21±0,16 ^{&}	5,72±0,38
Амплитуда фазных сокращений, мН	0,67±0,08*	0,44±0,06 [#]	0,76±0,06 ^{&}	1,08±0,10

Примечание. (адр-) – адреналэктомированные крысы; (адр-) + Dex - адреналэктомированные крысы + дексаметазон; * - различия достоверны по отношению к данным в контроле, $p < 0,05$; ** - то же, $p < 0,01$; [#] - различия достоверны по отношению к данным, зарегистрированным при исследовании препаратов от животных с сепсисом, $p < 0,01$; [&] - различия достоверны по отношению к данным, зарегистрированным при исследовании препаратов от адреналэктомированных животных с сепсисом, $p < 0,01$.

5.3.2. Механизмы действия глюкокортикоидов на сократительную функцию лимфатических сосудов

В первой серии экспериментов исследовали возможную роль iNOS в ингибировании сократительной функции ЛС. В раствор, омывающий ЛС, вводили селективный ингибитор индуцибельной синтазы NO – 1400W. 1400W не приводил к статистически значимым изменениям параметров сократительной активности ЛС от контрольных животных, но у крыс с сепсисом вызывал существенное повышение тонуса и увеличение частоты и амплитуды фазных сокращений ЛС (Рисунок 5.14).

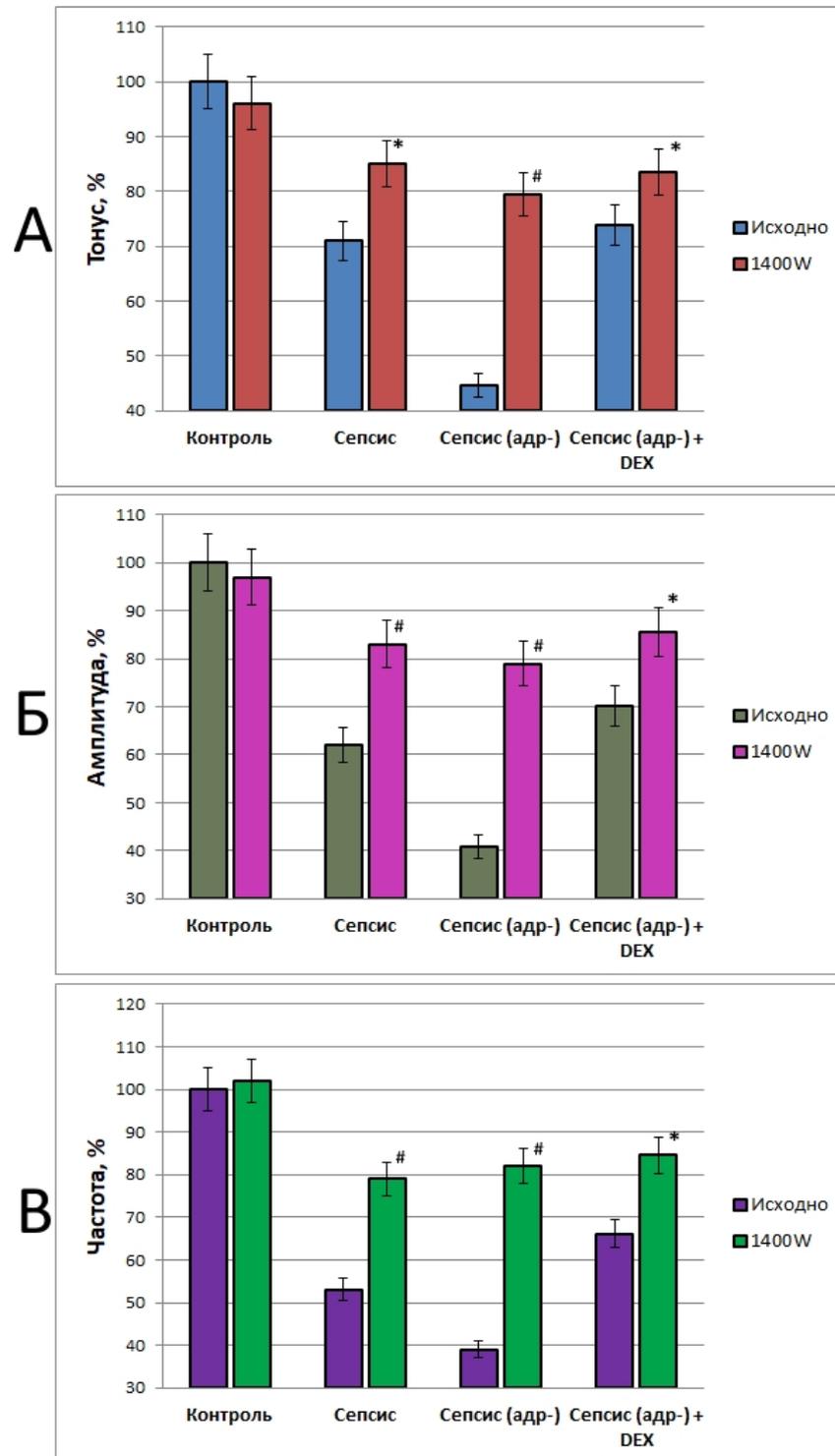


Рисунок 5.14 – Параметры сократительной активности кишечного ствола септических крыс при действии ингибитора iNOS – 1400W: А – тонус, Б – амплитуда фазных сокращений, В – частота фазных сокращений

Примечание. (адр-) – адреналэктомированные крысы; (адр-) + Dex - адреналэктомированные крысы + дексаметазон; изменения всех параметров у септических крыс при действии 1400W достоверны: * - $p < 0,05$; # - $p < 0,01$.

Максимальное увеличение параметров сократительной активности при применении 1400W наблюдалось у адреналэктомированных животных, а минимальное – у адреналэктомированных крыс, которым до лигирования-пункции слепой кишки вводился дексаметазон.

Поскольку в разделе 5.2 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 индуцибельную циклооксигеназу, мы провели исследования этого механизма *in vivo*.

Сегменты ЛС от контрольных и септических животных помещали в камеру с проточным физиологическим раствором и после установления стабильных параметров сократительной деятельности препаратов в раствор вводили династат - селективный ингибитор COX-2. Ингибирование COX-2 приводило к выраженным изменениям тонуса и частоты и амплитуды фазных сокращений ЛС (Рисунок 5.15). Максимальное увеличение параметров сократительной активности при действии династата было зарегистрировано при исследовании ЛС от адреналэктомированных крыс с сепсисом.

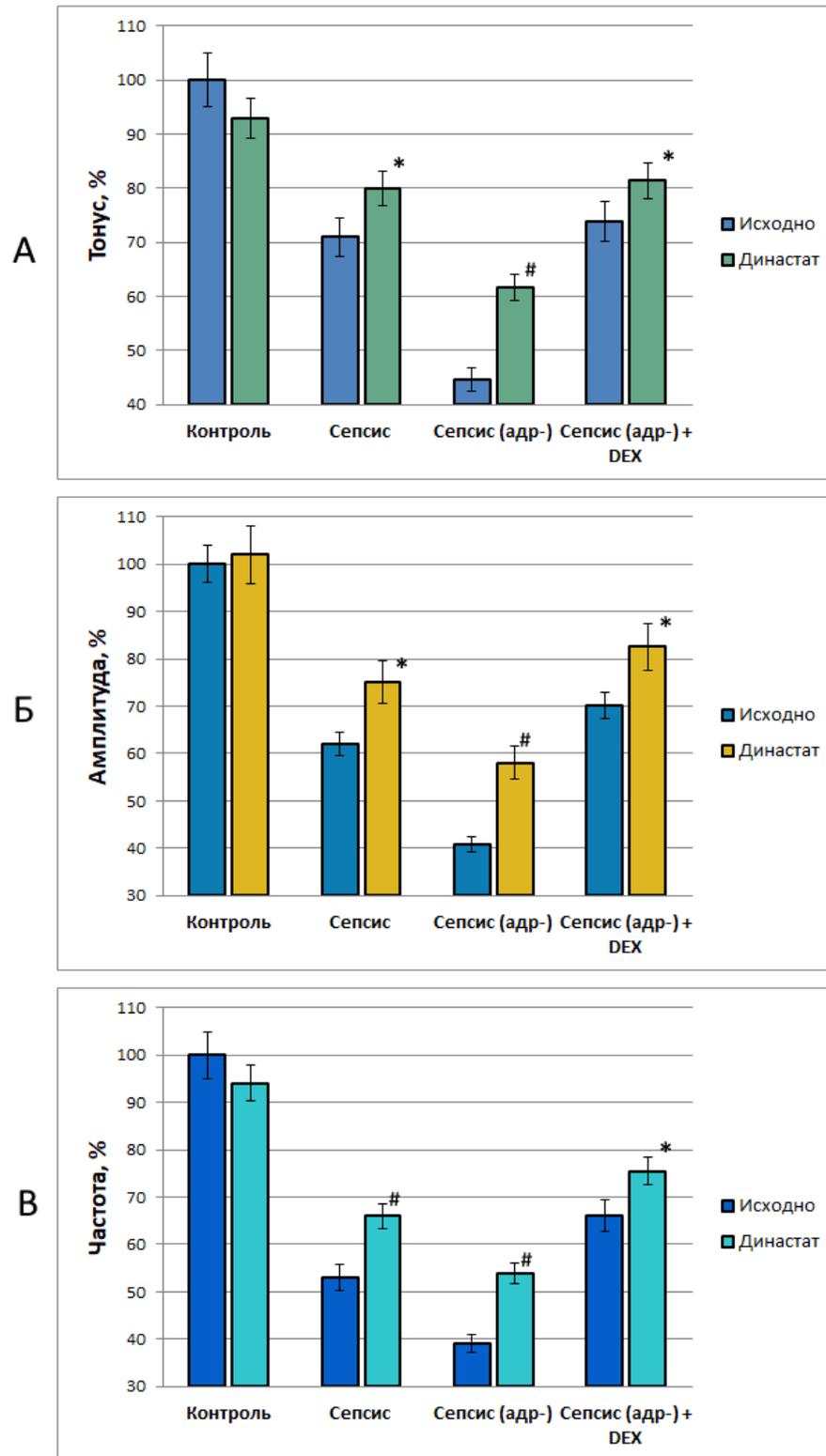


Рисунок 5.15 – Параметры сократительной активности кишечного ствола септических крыс при действии ингибитора COX-2 – династата: А – тонус, Б – амплитуда фазных сокращений, В – частота фазных сокращений

Примечание. (адр-) – адреналэктомированные крысы; (адр-) + Dex - адреналэктомированные крысы + дексаметазон; изменения всех параметров у септических крыс при действии династата достоверны: * - $p < 0,05$; # - $p < 0,01$.

5.3.3. Сократительная функция лимфатических узлов у септических животных при действии глюкокортикоидов

В процессе исследования брыжеечных ЛУ от животных с абдоминальным сепсисом показало значительное снижение параметров их сократительной активности по сравнению с интактными крысами. Наиболее выраженными были изменения тонуса капсулы ЛУ. Частота фазных сокращений также снижалась до 15-20% от исходной. Помимо этого, на фоне низкого уровня тонического напряжения у части ЛУ (11 из 28) наблюдалось прекращений фазных сокращений. Максимальное угнетение сократительной активности наблюдалось в ЛУ от адреналэктомированных крыс с сепсисом. В Таблице 5.7 представлены данные, полученные при обработке показателей сократительной активности ЛУ, у которых спонтанная сократительная активность сохранялась.

Таблица 5.7 – Параметры сократительной активности лимфатических узлов септических крыс

Параметры сократительной активности	Крысы с сепсисом	Крысы с сепсисом (адр -)	Крысы с сепсисом (адр -) + DEX	Контроль
Тонус, мН	0,86±0,07*	0,49±0,06 [#]	1,12±0,08 ^{&}	1,94±0,15
Частота фазных сокращений, мин ⁻¹	0,34±0,03*	0,19±0,04 [#]	0,47±0,04 ^{&}	1,2±0,08
Амплитуда фазных сокращений, мН	0,71±0,05*	0,44±0,03 [#]	0,80±0,05 ^{&}	1,76±0,11

Примечание. (адр-) – адреналэктомированные крысы; (адр-)+Dex - адреналэктомированные крысы + дексаметазон; * - различия достоверны по отношению к данным в контроле, $p < 0,01$; # - различия достоверны по отношению к данным, зарегистрированным при исследовании препаратов от животных с сепсисом, $p < 0,01$; & - различия достоверны по отношению к данным, зарегистрированным при исследовании препаратов от адреналэктомированных животных с сепсисом, $p < 0,01$.

5.3.4. Механизмы действия глюкокортикоидов на сократительную функцию лимфатических узлов

С целью определения вклада эндотелия в ингибирование сократительной функции ЛУ у септических животных часть полосок ЛУ ($n=8$) дезэндотелизировали (удаляли субкапсулярный синус). Дезэндотелизированные препараты имели значительно больший тонус по сравнению с интактными, амплитуда и частота их фазных сокращений также была выше. Применение ингибиторов iNOS и COX-2 сопровождалось дополнительным повышением тонуса и учащением ритма фазных сокращений ЛУ (Рисунок 5.16).

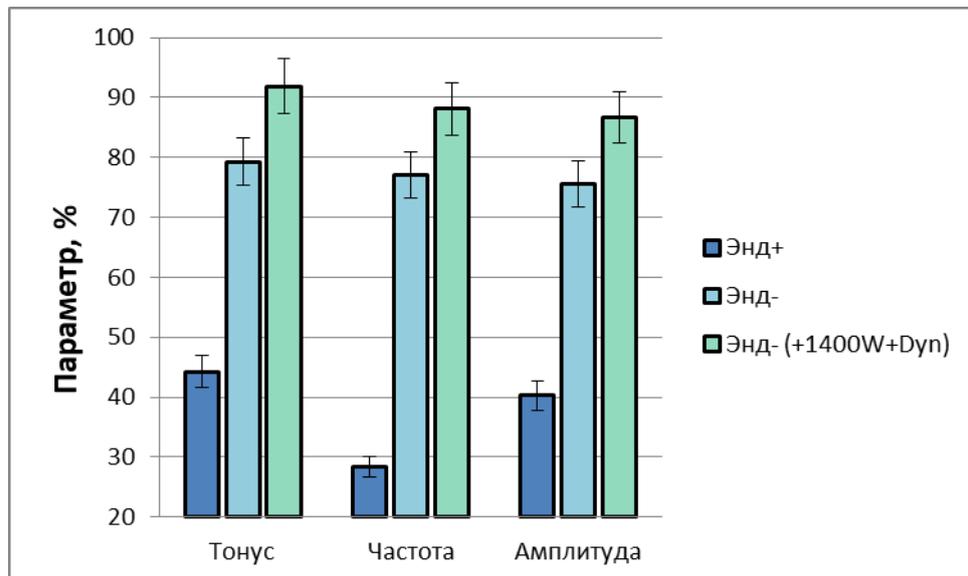


Рисунок 5.16 – Параметры сократительной активности ЛУ септических крыс (интактные (Энд+) и дезэндотелизированные (Энд-) препараты)

Дальнейшие исследования механизмов действия дексаметазона на сократительную функцию ЛУ проводились 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 (Рисунок 5.17).

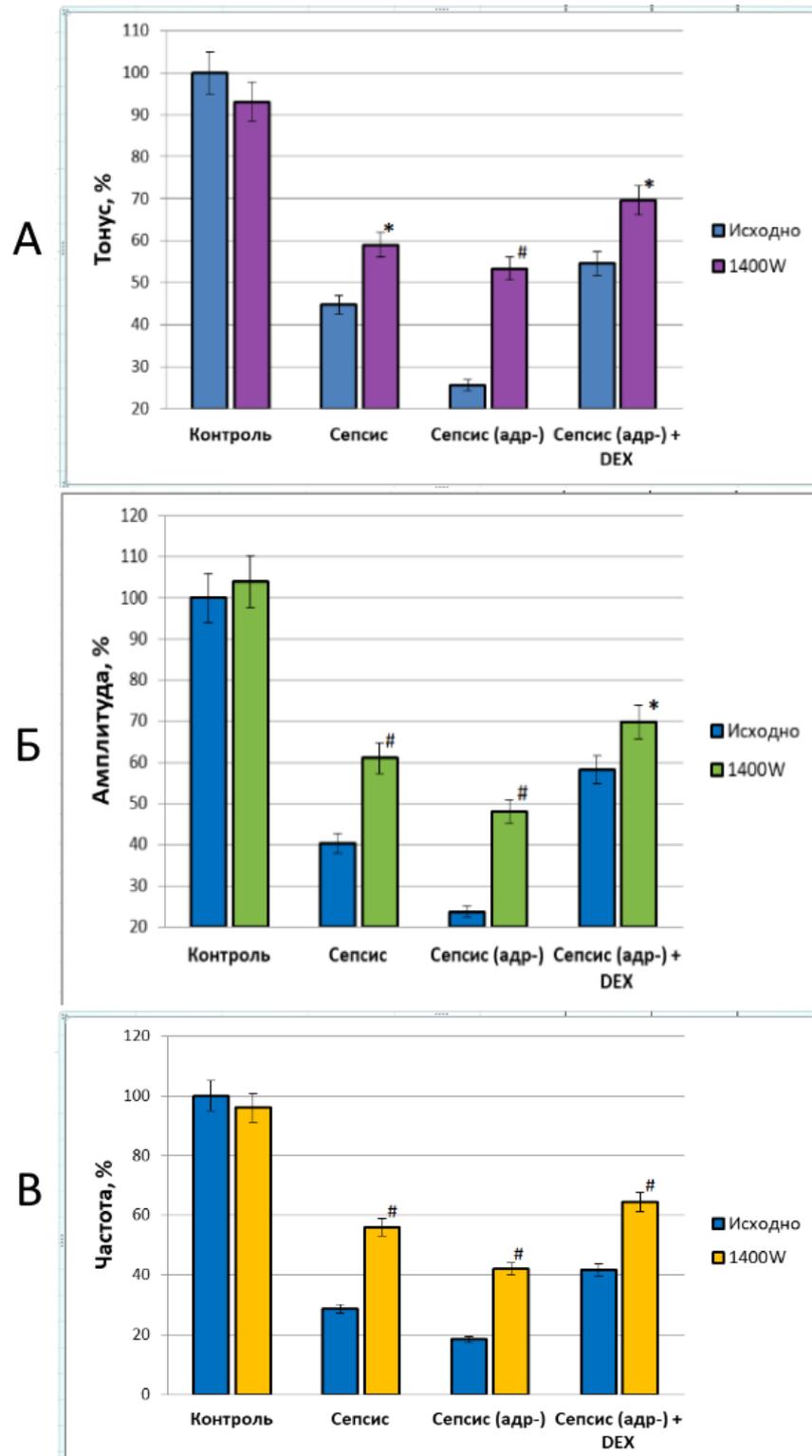


Рисунок 5.17 – Параметры сократительной активности септических крыс при ингибировании iNOS 1400W: А – тонус, Б – амплитуда фазных сокращений, В – частота фазных сокращений

Примечание. (адр-) – адреналэктомизированные крысы; (адр-) + Dex - адреналэктомизированные крысы + дексаметазон; изменения всех параметров у септических крыс при действии 1400W достоверны: * - $p < 0,05$; # - $p < 0,01$.

Также были проведены исследования сократительной функции ЛУ с применением селективный ингибитор СОХ-2 – династата. Ингибирование СОХ-2 приводило к существенным изменениям тонуса и частоты фазных сокращений ЛУ (Рисунок 5.18).

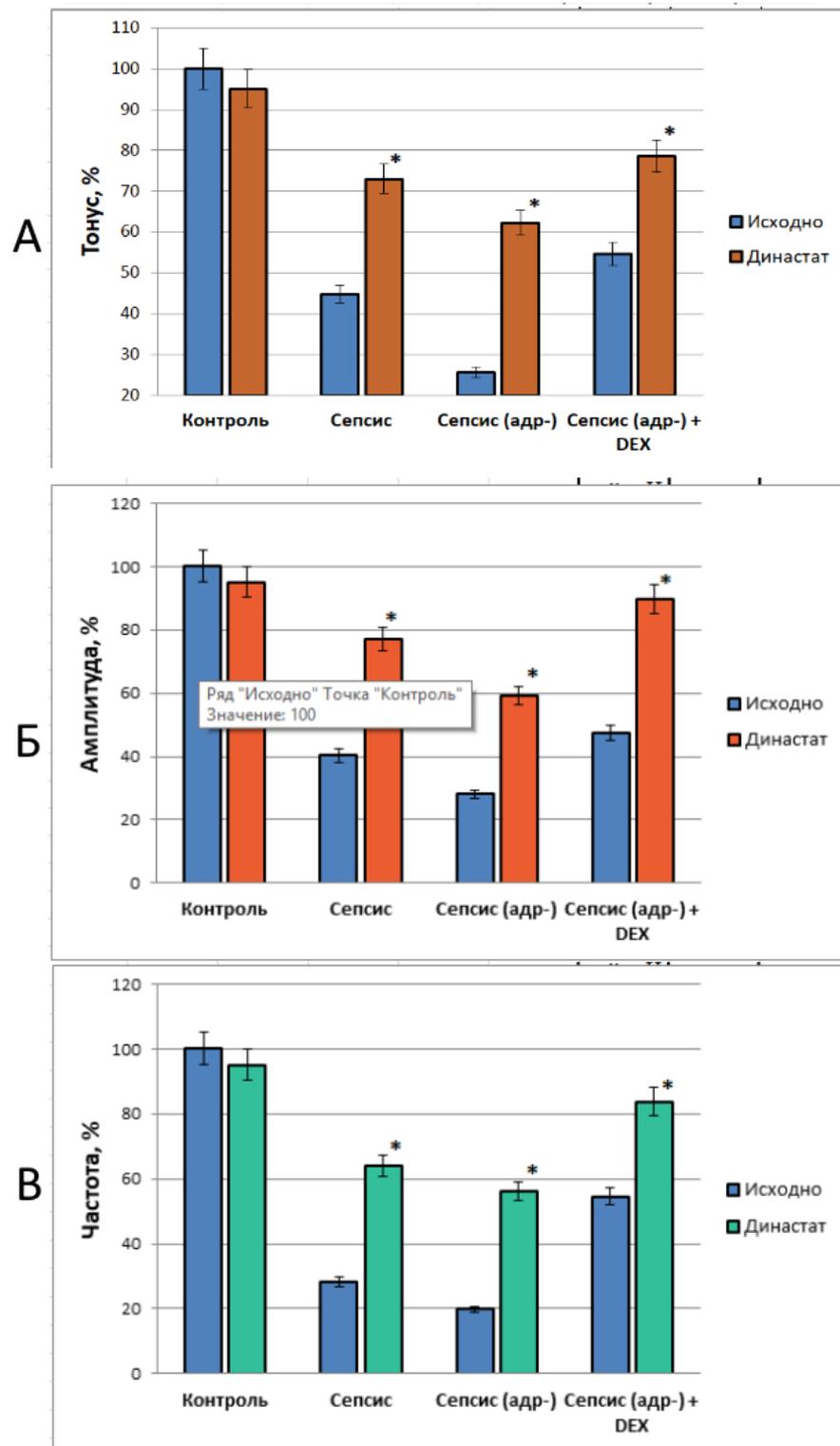


Рисунок 5.18 – Параметры сократительной активности лимфатических узлов септических крыс при действии ингибитора COX-2 – династата: А – тонус, Б – амплитуда фазных сокращений, В – частота фазных сокращений

Примечание. (адр-) – адреналэктомированные крысы; (адр-)+Dex - адреналэктомированные крысы + дексаметазон; изменения параметров у септических крыс при действии династата достоверны: * - $p < 0,01$.

Поскольку в вышеописанных экспериментах было установлено, что основной ингибирующий механизм в ЛУ при сепсисе является простагландин-опосредованным, мы с целью определения типов простагландинов, принимающих участие в ингибировании сократительной функции ЛУ при сепсисе, использовали селективный антагонист IP-рецепторов – RO1138452 и антагонист EP₄-рецепторов – GW627368X. RO1138452 вводили в раствор после установления стабильных параметров сократительной активности ЛУ крыс с сепсисом, Ингибирование IP-рецепторов сопровождалось выраженным увеличением тонуса, частоты и амплитуды фазных сокращений ЛУ септических крыс (Таблица 5.8).

Таблица 5.8 – Параметры сократительной активности лимфатических узлов крыс сепсисом

Параметры сократительной активности	Крысы с сепсисом	Крысы с сепсисом + RO1138452
Тонус, мН	0,86±0,07	1,19±0,06*
Частота фазных сокращений, мин ⁻¹	0,34±0,03	0,63±0,04*
Амплитуда фазных сокращений, мН	0,71±0,05	1,09±0,03*

Примечание: * - различия достоверны, $p < 0,01$.

Применение в аналогичных экспериментах антагониста EP_4 -рецепторов – GW627368X не приводило к достоверным изменениям тонуса, частоты и амплитуды фазных сокращений ЛУ септических крыс.

5.4. Резюме

В данной главе представлены результаты исследования негеномных и геномных эффектов ГК на сократительную активность ЛС и ЛУ *in vivo* и *in vitro*.

Негеномные эффекты ГК на ЛС и ЛУ были изучены на изолированных брыжеечных ЛС и ЛУ быка. Было установлено, что негеномные эффекты ГК в терапевтических концентрациях на ЛС и ЛУ заключаются в повышении тонуса стенки ЛС и капсулы ЛУ и увеличении частоты их спонтанных сокращений с одновременным снижением амплитуды. Механизмы действия ГК на ЛС и ЛУ оказались множественными: 1) ГК ингибируют синтез эндотелиальных вазодилататоров – NO и простаглицлина, 2) потенцируют стимулирующий эффект норадреналина на α -адренорецепторы гладкомышечных клеток, 3) активируют в гладкомышечных клетках сигнальный путь RhoA/ROCK.

Часть исследований геномных эффектов ГК проводилось *in vitro* на брыжеечных ЛС и ЛУ быка. В опытах с 6-часовой инкубацией ЛС и ЛУ в растворе с ЛПС было установлено, что ЛПС оказывает ингибирующий эффект на сократительную функцию ЛС и ЛУ посредством экспрессии iNOS и COX-2 в эндотелиальных и гладкомышечных клетках стенки ЛС и капсулы ЛУ. Показано, что дексаметазон обладает выраженными протективными свойствами при действии ЛПС на сократительную функцию ЛС и ЛУ, подавляя экспрессию iNOS и COX-2 и предотвращая образование избыточных количеств NO и вазодилатирующих простаглицлинов.

Вторая часть исследований геномных эффектов ГК проводилась на крысах *in vivo*. У крыс вызывали развитие абдоминального сепсиса. Показано, что ингибирующий эффект сепсиса на сократительную функцию ЛС и ЛУ является преимущественно эндотелий-зависимым. Установлено, что в ЛС сепсис приводит к ингибированию их сократительной активности в основном посредством экспрессии iNOS и гиперпродукции NO. Простаглицлин-опосредованная

дилатация также имеет место, но этот механизм является менее значимым. Напротив, в ЛУ ингибирующий эффект сепсиса заключается преимущественно в экспрессии COX-2, что сопровождается значительным повышением продукции PGI₂, вызывающего расслабление ГМК капсулы ЛУ. Эндогенные и экзогенные ГК при сепсисе оказывают протективное действие на сократительную функцию ЛС и ЛУ посредством ингибирования экспрессии iNOS и COX-2.

ГЛАВА 6

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эффективное функционирование клеток и тканей организма критически зависит от гомеостаза интерстициальной жидкости, а объем и состав последней определяются интенсивностью ее обмена с кровью и адекватностью лимфотока. Лимфатическая сосудистая сеть начинается с капилляров, которые переходят в посткапилляры и ЛС. В стенке мелких ЛС имеется один слой ГМК, а в более крупных - два или три, ориентированных преимущественно по крутой спирали [10], которые за счет своих активных ритмических сокращений обеспечивают процесс продвижения и доставки лимфы в ЛУ [14, 26]. В физиологических условиях основным механизмом регуляции лимфотока является саморегуляция, которая обеспечивается эндотелиальными клетками и ГМК [47, 54].

Как уже было указано в обзоре литературы, лимфатическая система обеспечивает не только структурную основу для осуществления иммунных реакций, но и осуществляет модуляцию иммунного ответа, регулируя его на разных этапах, в т.ч. 1) на этапе транспорта лимфы, содержащей антигены и антигенпрезентирующие клетки, от мест образования до региональных ЛУ, 2) при перемещении компонентов лимфы, антигенов и лимфоцитов по ЛУ, 3) при выходе лимфоцитов из ЛУ, 4) на этапе доставки лимфоцитов из ЛУ в системный кровоток [106, 163].

При повреждении кожи или слизистых оболочек происходит разрушение эпителиальных клеток, нарушается естественный барьер и в поврежденную ткань внедряются бактерии, приводя к развитию инфекционного воспаления [36, 76]. Воспалительный процесс сопровождается образованием различных физиологически активных веществ и, в частности, цитокинов, обладающих как

провоспалительными (интерлейкины 1,2,6, интерферон- γ , фактор некроза опухоли - TNF- α и др.); так и противовоспалительными свойствам (интерлейкины 4,10,13, трансформирующий фактор роста- β - TGF β) [36, 76]. Интерлейкины и интерфероны оказывают влияние на различные клетки организма не только паракринно, в очаге воспаления, но и на большом расстоянии от него [38]. Процесс воспаления не ограничивается локальными изменениями в тканях, оно, как правило, сопровождается системными реакциями различной выраженности. Важнейшей системной реакцией при воспалении является активация гипоталамо-гипофизно-адренкортикальной системы, обеспечивающей обратную связь и контроль воспаления и иммунитета [24, 76, 143]. Глюкокортикоиды, концентрация которых возрастает при воспалении, оказывают преимущественно противовоспалительное действие [108]. Глюкокортикоиды снижают продукцию моноцитами, макрофагами и лимфоцитами провоспалительных цитокинов (IL-1, IL-2, IL-4, TNF и др.) [260]. Глюкокортикоиды также влияют как на врожденный, так и на адаптивный иммунный ответ, подавляя созревание, дифференцировку и пролиферацию лейкоцитов всех подтипов [115].

В нашей работе при подборе препаратов для исследования их влияния на транспортную функцию ЛС и ЛУ мы исходили из двух критериев: 1) препарат является естественным модулятором иммунного ответа и 2) он достаточно широко применяется в медицинской практике. После ознакомления с литературой мы остановились на трех группах веществ: интерфероны - IFN- α -2b, IFN- β -1a и IFN- γ ; интерлейкины - IL-1 β и IL-2; глюкокортикоиды – гидрокортизон и дексаметазон.

Были изучены параметры сократительной активности ЛС и ЛУ при действии трех видов **интерферонов**: α , β и γ . Все они являются белками с молекулярной массой 18-20 кДа и, соответственно, применяются преимущественно парентерально.

IFN- α -2b вырабатывается в организме лейкоцитами, ингибирует размножение вирусов и стимулирует иммунные реакции [28, 30]. Он применяется в клинике в качестве иммуномодулятора при остром и хроническом гепатите, клещевом энцефалите, а также при лечении опухолей: волосатоклеточный лейкоз, множественная миелома, хронический миелолейкоз и др. При этих заболеваниях рекомендуется парентеральное введение интерферона, соответственно, имея высокую молекулярную массу, препарат всасывается в лимфатические капилляры, транспортируется ЛС, и только при поступлении с лимфой в кровь, разносится по всему организму.

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.

С целью определения участия эндотелиальных клеток в реализации ингибиторного эффекта IFN- α -2b на ЛС, у части препаратов мы удаляли эндотелий. 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 нам основание предположить, что ингибиторный эффект IFN- α -2b на ЛС является преимущественно эндотелий-опосредованным.

Из литературных данных известно, что эндотелий ЛС разных животных в физиологических условиях, а также при действии ряда фармакологических агентов продуцирует NO и простаглицлин (PGI₂) [102, 136, 274]. Мы провели 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 ME/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 простациклина 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 простациклин 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 нам основание предположить, что помимо NO и простациклина в реализации ингибиторного эффекта IFN- α -2b на ЛС принимают участие какие-то другие эндотелий-опосредованные механизмы. Из литературных данных известно, что в артериях эндотелий-опосредованную вазодилатацию обеспечивают не только NO и простациклин, но и эндотелиальная гиперполяризация [135]. Разными авторами при исследовании мелких артерий различных животных установлено, что эндотелий-зависимую гиперполяризацию ГМК обеспечивают несколько различных веществ, продуцируемых эндотелиальными клетками: эпоксиэйкозатриеновые кислоты, пероксид водорода, сероводород и др. [94, 157, 245]. Общим в их действии является то, что они активируют Ca²⁺-чувствительные

K^+ -каналы малой, промежуточной или большой проводимости, приводя в итоге к гиперполяризации мембраны ГМК, их расслаблению и вазодилатации [135].

При исследовании участия эндотелиальной гиперполяризации в дилатации ЛС, вызванной $IFN-\alpha-2b$, продукцию NO и простациклина, блокировали L-NAME и индометацином. После частичного восстановления тонуса ЛС в раствор поочередно вводили тетраэтиламмония хлорид (ТЭА) - блокатор Ca^{2+} -чувствительных K^+ -каналов большой проводимости, харибдотоксин, являющийся блокатором Ca^{2+} -чувствительных K^+ -каналов промежуточной и большой проводимости, и апамин – блокатор Ca^{2+} -чувствительных K^+ -каналов малой проводимости [97, 229]. 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 $IFN-\alpha-2b$ активирует в ЛС Ca^{2+} -чувствительные K^+ -каналы малой и промежуточной проводимости и тем самым приводит к эндотелиальной гиперполяризации и расслаблению ГМК.

Второй вид интерферона - **$IFN-\beta-1a$** , рекомендуется для лечения хронического гепатита В и С, используется в качестве одного из компонентов противоопухолевой терапии при опухолях шейки матки, при карциноме молочной железы, Применяется для лечения рассеянного склероза. По химическому строению является белком с молекулярной массой 18500 дальтон, соответственно, применяется, в основном, парентерально и транспортируется по лимфатической системе.

Его влияние на сократительную функцию ЛС было изучено нами по схеме, аналогичной исследованию эффектов $IFN-\alpha-2b$. Действие $IFN-\beta-1a$ 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 деэндоотелизированными сегментами ЛС было установлено, что эффект IFN- β -1a является эндотелий-зависимым.

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. Что касается влияния IFN- β -1a на эндотелиальную гиперполяризацию, то этот механизм в ЛС был слабо выражен и нам удалось подтвердить только значимую 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.

Третий вид интерферонов, эффекты которого на ЛС мы исследовали в нашей работе, был **интерферон γ** (IFN- γ). В организме образуется Т-хелперами, Т-киллерами, НК-клетками и дендритными клетками [246]. Он обладает противовирусным и иммуномодулирующим действием, является активатором макрофагов и усиливает их противоопухолевую активность, усиливает противоопухолевое действие цитотоксических лимфоцитов, подавляет рост опухолевых клеток. Высокоаффинные рецепторы к IFN- γ имеются на поверхности большинства клеток организма, в т.ч. на эндотелиальных и гладкомышечных клетках [183].

Схема исследования эффектов и механизмов действия IFN- γ на сократительную функцию брыжеечных ЛС быка была аналогичной вышеописанным. 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 эндотелий-зависимый механизм ингибирующего действия IFN- γ . Исследования роли NO и индометацина в дилатационном эффекте IFN- γ на ЛС показало, что преобладающим механизмом дилатации является простациклин-опосредованный механизм. NO также принимал участие в дилатации ЛС при действии IFN- γ , но его роль была менее значимой.

Исследование роли эндотелий-зависимой 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 нам основание заключить об активации интерфероном- γ Ca^{2+} -чувствительных K^+ -каналов большой проводимости на эндотелиоцитах и гладкомышечных клетках ЛС. Ранее важное значение Ca^{2+} -чувствительных K^+ -каналов большой проводимости на мембране ГМК в вазодилатации было показано при исследовании артерий различных животных. Их активация сопровождается гиперполяризациями мембраны ГМК, снижением концентрации внутриклеточного Ca^{2+} и расслаблением миоцитов [156].

При исследовании эффектов интерферонов на лимфатические узлы эксперименты проводили по аналогичной схеме. Все три изучаемых интерферона

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 дезэндотелизированные 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 эндотелий-зависимым.

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 в опытах с интактными полосками капсулы ЛУ индометацина, являющегося ингибитором циклооксигеназы, 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 простаглицлина, 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.

Следующий этап исследования был посвящен изучению эффектов и механизмов действия **интерлейкинов** на сократительную функцию ЛС и ЛУ. Мы остановились на двух интерлейкинах, которые соответствовали ранее описанным критериям отбора: интерлейкин-1 β (IL-1 β) и интерлейкин-2 (IL-2).

IL-1 β продуцируется макрофагами, дендритными клетками, эндотелиоцитами, фибробластами и купферовскими клетками печени. Представляет собой белок с молекулярной массой 17,5 кДа. Мишенями для IL-1 β служат клетки практически всех органов и тканей [66]. IL-1 является медиатором острого и хронического воспаления, оказывает провоспалительное и пирогенное действие, участвует практически во всех этапах иммунного ответа, способствует активации клеток в очаге воспаления, усиливает продукцию других цитокинов и простаглицлинов, вызывает дегрануляцию тучных клеток. IL-1 также регулирует функции эндотелия, способен индуцировать NO-синтазы, и таким образом модулирует тонус кровеносных сосудов [271].

Препараты IL-1 широко используются в клинической практике: при сепсисе, перитоните, туберкулезе, гепатитах, ВИЧ-инфекции. Применяется в лечении длительно незаживающих трофических язв, герпетических поражений слизистых оболочек и др. [259]. Будучи белковой молекулой с большой молекулярной массой (около 17,5 кДа) IL-1 вводится парентерально и

всасывается в лимфатические капилляры, а в дальнейшем транспортируется по ЛС и ЛУ, контактируя с эндотелиальными и гладкомышечными клетками.

В нашем исследовании IL-1 β при добавлении в физиологический раствор, омывающий ЛС, в концентрации 100 нг/л оказывал выраженный ингибиторный эффект как на тонус ЛС, так и на амплитуду и частоту фазных сокращений. Ингибиторный эффект развивался достаточно быстро, что 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 [66] и гладкомышечных [123]. 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 эндотелий-зависимом 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.

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 нам основание сделать определенные 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 [260]. На деэндотелизированные препараты ЛС слабо реагировали на IL-1 β и, с учетом информации о том, что на мембране эндотелиальных клеток располагается значительное количество рецепторов IL-1 I типа [66], мы полагаем, 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. Как уже указывалось ранее, 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 эндотелий-зависимой гиперполяризации, приводящей к расслаблению ГМК ЛС. Эта часть ингибирующего эффекта IL-1 β предотвращалась как при предварительном

введении в физиологический раствор ингибиторов Ca^{2+} -зависимых K^+ -каналов малой и промежуточной проводимости – апамина и харибдотоксина, так и при добавлении этих ингибиторов на фоне действия $\text{IL-1}\beta$ [229]. Роль простациклина в развитии ингибиторного эффекта $\text{IL-1}\beta$ значительно в ЛС была незначительной.

IL-2 представляет собой гликопротеин с молекулярной массой 15 кДа. Вырабатывается Т-лимфоцитами, является плейотропным цитокином, оказывающим воздействие на многочисленные клетки-мишени, однако основными являются Т-лимфоциты, на которые он оказывает антиапоптотическое действие, продляя срок жизни этих клеток. Важнейшим эффектом IL-2 является подавление аутоиммунных реакций [138].

IL-2 обладает противоопухолевым и противоифекционным действием, активирует процессы репарации и регенерации тканей, способствует адекватному взаимодействию иммунной, эндокринной и нервной систем. В клиниках применяется при сепсисе, перитоните, туберкулезе, бруцеллезе, гепатитах, при коррекции вторичных иммунодефицитов, для лечения аутоиммунных заболеваний и иммунотерапии злокачественных новообразований [243].

В наших экспериментах 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.

В последние годы в нескольких работах установлено, что в стенке кровеносных сосудов на границе между эндотелиальными и ГМК выявляется достаточно высокая концентрация IL-2 [160]. Было также показано, что на эндотелиальных и ГМК некоторых артерий экспрессируется рецептор IL-2 [158],

и, что наиболее интересно, IL-2R были обнаружены на эндотелиальных и ГМК центральной артериолы селезенки [160], являющейся структурой лимфатической системы. Подобных исследований на ЛС до настоящего времени не проводилось.

Имеются данные о том, что IL-2 активирует в клетках, как минимум, три внутриклеточных сигнальных пути [121], в т.ч. стимулирует фосфоинозитидный механизм, эффективно функционирующий в ГМК [198]. С целью оценки возможной роли этого сигнального пути в повышении тонуса ГМК ЛС мы провели опыты с применением LY-294002, являющегося ингибитором фосфоинозитид-3-киназы [254]. На фоне блокады фосфоинозитид-3-киназы IL-2 не приводил к достоверным изменениям параметров сократительной деятельности ГМК ЛС. Мы полагаем, 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 [103], 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 [121], 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 нами было обнаружено 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, мы провели 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 простаглицина эндотелиальными клетками. Наши данные не позволяют сделать заключение о непосредственном влиянии IL-2R на эндотелиальные клетки. Исследования последних лет показывают, что в субкапсулярном синусе ЛУ в физиологических условиях находятся различные клетки: субкапсулярные синусовые макрофаги, дендритные клетки и NK-клетки [180,248], функциональное состояние которых под действием IL-2 может изменяться. В этом случае они могут продуцировать различные цитокины [153], которые, в свою очередь, стимулируют эндотелиоциты с последующим синтезом ими простаглицина.

Важнейшим элементом в системе иммунной защиты организма является наличие обратной связи, позволяющей контролировать интенсивность и

продолжительность иммунных реакций. Данные различных лабораторий свидетельствуют о том, что основные гормоны стресса - **глюкокортикоиды**, ингибируют образование провоспалительных цитокинов и стимулируют производство противовоспалительных цитокинов. Гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая ось защищает организм от перепроизводства провоспалительных цитокинов и чрезмерного повреждения тканей [127, 206]. Таким образом, ГК, выполняя в организме множество разнообразных функций, являются и важнейшими модуляторами иммунного ответа. В работах последних десятилетий установлено, что ГК оказывают свое иммуносупрессивное действие за счёт взаимодействия со специфическими плазматическими рецепторами лимфоцитов и других клеток, участвующих в реализации воспалительной реакции [209, 256].

При изучении **негеномных эффектов ГК на ЛС** в наших опытах 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 [47, 48]. Стимулирующий эффект ГК начинал проявляться на 4-5 минутах воздействия и достигал максимума к 7-10 минутам. Хорошо известно, что ГК оказывают влияние на различные клетки организма двумя путями: геномным и негеномным [112, 184]. Быстрое развитие эффекта дексаметазона на сократительную функцию ЛС (в течение нескольких минут) дало нам основание заключить, что он реализуется посредством негеномного механизма [184].

Меньшие реакции деэндотелизированных ЛС на ГК по сравнению с аналогичными реакциями интактных ЛС дали нам 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, мы пришли 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. 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.

Таким образом, мы пришли к заключению, что часть стимулирующего эффекта ГК на ЛС реализуется посредством ингибирования эндотелиальной NO-синтазы. Ранее [45] 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.

В наших опытах совместное применение L-NAME и индометацина уменьшало стимулирующий эффект ГК на ЛС, но не отменяло его. Ранее при исследовании эффектов ГК у септических животных было установлено, что ГК усиливают эффект симпатических нервов на ГМК артерий, что привело авторов к заключению, что подобный эффект ГК был обусловлен торможением обратного захвата норадреналина в нервные окончания [182]. Мы исследовали эндотелий-независимые реакции ЛС на ГК на фоне норадреналина – в этом случае дексаметазон оказывал значительно меньший стимулирующий эффект по сравнению с их 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 мы пришли к заключению, что ГК в ЛС так же, как и в артериях и в ЦНС [182, 202] ингибируют обратный захват норадреналина и тем самым способствуют повышению тонуса и увеличению частоты фазных сокращений ЛС.

Поскольку в вышеописанных опытах стимулирующий эффект дексаметазона на фоне блокады альфа-адренорецепторов уменьшался, но не отменялся, оставался открытым вопрос о механизме этого эффекта. Ранее в опытах на препаратах кровеносных сосудов крыс было показано, что дексаметазон стимулирует норадреналин-индуцированное сокращение гладких мышц посредством активации RhoA / Rho киназы [116, 257]. Учитывая эти данные, мы провели исследование участия Rho-киназы в стимулирующем эффекте дексаметазона на ГМК ЛС. В раствор с деэндоотелизированными 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 [116].

Геномные механизмы ГК реализуются посредством связывания ГК со специфическим цитоплазматическим глюкокортикоидным рецептором, который после связывания транслоцирует в ядро и изменяет экспрессию генов [111]. Эффекты этого механизма проявляются не ранее, чем через 30 минут после образования гормон-рецепторного комплекса [256], а, по мнению других авторов – не ранее, чем через 3-4 часа [244]. Изучение геномных механизмов действия ГК

на ЛС мы проводили в двух вариантах: при 6-часовой инкубации изолированных ЛС в растворе с ЛПС и при моделировании абдоминального сепсиса.

Из литературных данных известно, что снижение тонуса артерий при сепсисе обусловлено преимущественно NO и PGI₂, образующимися в значительных количествах макрофагами, эндотелиальными, гладкомышечными клетками и фибробластами под влиянием ЛПС и цитокинов [205, 234].

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 субстанцию 1400W, являющуюся селективным ингибитором iNOS. 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.

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.

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 нами 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* [118, 149, 179, 232, 236]. 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, мы провели исследования этого механизма *in vivo* на септических животных. Опыты были проведены 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. Мы не зарегистрировали при применении династата 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 СОХ-2. Известно, что при сепсисе в клетках различных органов и тканей значительно возрастает экспрессия СОХ-2 с образованием простаноидов, обладающих вазодилататорным эффектом [171, 177, 235]. С целью определения вида простаноида, приводящего к подавлению сократительной активности ЛС нами 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 СОХ-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 дезндотелизированных 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 нам основание сделать заключение о том, что при сепсисе эндогенные и экзогенные глюкокортикоиды оказывают протективный эффект на транспортную функцию ЛС также путем ингибирования экспрессии СОХ-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 [208].

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 судкапсулярного синуса ЛУ продуцируют фоновое количество NO и PGI₂ [45], 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, мы провели 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. Деэндотелизированные 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 проводились 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.

Эксперименты, проведенные по такой же схеме с применением селективного ингибитора COX-2 – династата, показали что часть ингибиторного эффекта сепсиса на сократительную функцию ЛУ 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. Добавление в физиологический раствор династата сопровождалось недостоверными изменениями их сократительной активности.

Представленные данные приводят нас к заключению, что в ЛС и ЛУ эндогенные и экзогенные глюкокортикоиды при сепсисе так же, как в брыжеечных артериях крыс [185, 228] существенно ослабляют экспрессию iNOS и COX-2 и таким образом 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 узлами активируют в эндотелиальных клетках NO-синтазу и циклооксигеназу. В лимфатических сосудах преобладает NO-зависимый механизм дилатации, в лимфатических узлах более значимой является простаглицлин-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 узлов является преимущественно эндотелий-зависимым. IL-1 β и IL-2 реализуют ингибирующие эффекты на гладкомышечные клетки посредством усиления продукции NO. IL-2 также стимулирует в ГМК фосфоинозитидный механизм, что приводит к повышению их 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-2 клетками стенки лимфатических сосудов и капсулы лимфатических узлов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авдеев, Г.И. Иммуноterapia опухолей / Г.И. Авдеев, М.М. Вядро, З.Г. Кадагидзе // Сер. Онкология. -1985. -Т. 14.- С. 11-18.
2. Айнсон, Х.Х. Лимфообразование. Физиология кровообращения. Физиология сосудистой системы / Х.Х. Айнсон. - Л.: Наука, 1984. – С. 306-317.
3. Артеменко, Д.П. Модификация метода одинарного сахарозного мостика / Д.П. Артеменко // Физиол. Журн УССР. – 1982. – Т. 28, № 3. – С. 374–380.
4. Баклыкова, Н.М. Нейро-гуморальные механизмы торможения моторной деятельности тонкой кишки и их значение при илеусе и перитоните. // Дис. докт. мед. наук. Ленинград. - 1965. - 22 с.
5. Белова, О.В. Роль цитокинов в иммунологической функции кожи / О.В. Белова, В.Я. Арион, В.И.Сергиенко // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2008. - № 1. - С. 41-55.
6. Белужников, А.Б. Комбинированная лимфотропная терапия в лечении больных с местным перитонитом / А.Б. Белужников // Вестник лимфологии. – 2008. – Т.3. – С. 54.
7. Борисов, А.В. Принципы конструкции лимфатического сосуда в свете теории лимфангиона / А.В. Борисов // Структурно-функциональные основы лимфатической системы (теоретические и прикладные аспекты). СПб.: СПбГМА, 1997. – Вып. 1. – С. 6–12.
8. Борисов, А.В. Конструкция и функция мышцы лимфатического клапана / А.В. Борисов // Мат. Всерос. конф. «Новое в лимфологии: клиника, теория, эксперимент», г. Москва, 23–25 сентября 1993 г. – М., 1993. – С. 22–23.
9. Борисов, А.В. Конструкция лимфангиона в норме и патологии / А.В. Борисов // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2005. – № 2(14). – С. 66-68.
10. Борисов, А.В. Теория конструкции лимфангиона / А.В. Борисов // Морфология. – 1997. – Т. 112, № 5. – С. 7–17.
11. Борисов, А.В. Лимфангионы грудного протока / А.В. Борисов // Грудной проток и лимфатические коллекторы организма. – Л.: ЛСГМИ, 1989. – С. 4–13.
12. Борисов, А.В. Анатомия лимфангиона / А.В. Борисов. – Нальчик: Полиграфсервис, 2007. – 296 с.
13. Борисов А.В. Архитектоника, гистотопография и взаимосвязь

- миоцитов лимфатического сосуда и узла / А.В. Борисов // Лимфатический узел: анатомия, эксперимент, патология, клиника. – Л.: ЛСГМИ. – 1987. – С. 4-14.
14. Борисов, А.В. Значение конструкции лимфангиона как структурно-функциональной единицы лимфатического сосуда для биологии и медицины // Мат. II съезда лимфологов России, г. Санкт-Петербург, 23–25 мая 2005 г. – СПб., 2005. – С.29–30.
 15. Борисов, А.В. Функциональная морфология лимфангиона / А.В. Борисов // Лимфатический сосуд. – Л.: ЛСГМИ, 1984. – С. 5–13.
 16. Борисова, Р.П. Морфофункциональные основы лимфотока при лимфедеме / Р.П. Борисова // Проблемы лимфологии. – Новосибирск: Сибмедиздат НГМУ, 1987. – С. 11.
 17. Борисова, Р.П. Теории транспорта лимфы – вчера, сегодня, завтра / Р.П. Борисова // Мат. II съезда лимфологов России, г. Санкт-Петербург, 23–25 мая 2005 г. – СПб., 2005. – С. 31–32
 18. Бородин, Ю.И. Общая анатомия лимфатической системы / Ю.И. Бородин, М.Р. Сапин, Л.Е. Этинген. – Новосибирск: Наука, 1990. – 243 с.
 19. Бородин, Ю.И. Регионарная гемо- и лимфоциркуляция и ее место в реализации общей циркуляторной схемы организма / Ю.И. Бородин // Лимфология: эксперимент, клиника. – Новосибирск: НИИКиЭЛ СО РАМН, 1995. – Т. 3. – С. 5–8.
 20. Буянов, В. М. Лимфология эндотоксикоза / В.М. Буянов, А.А. Алексеев. – М., 1990. – 272 с.
 21. Буянов, В.М. Экспериментальная модель острого гнойного перитонита / В.М. Буянов, Г.В. Родоман, Г.Г. Белоус // Хирургия. - 1997.– № 1.–С.72–73.
 22. Выренков, Ю.Е. Лимфатический капилляр / Ю.Е. Выренков // Вестник лимфологии. – 2008. – Т. 3 – С. 50.
 23. Грибкова, И.В. NO активирует Ca²⁺-активируемый K⁺ ток гладкомышечных клеток хвостовой артерии крысы через GMP-зависимый механизм / И.В. Грибкова // Кардиология. – 2002. – № 8. – С. 34–37.
 24. Гусев, Е. Ю. Системное воспаление с позиции теории типового патологического процесса / Е.Ю. Гусев, В.А. Черешнев, Л.Н. Юрченко // Цитокины и воспаление. -2007. - Т. 6, -№ 4. - С. 9-21.
 25. Дзгоева, Ф. У. Тромбоксан А2 и простаглицлин у больных хроническим гломерулонефритом и ишемической болезнью сердца в условиях нефротоксического действия рентгеноконтрастных средств / Ф.У. Дзгоева, И.М. Кутырина //Протективное действие

- антагонистов кальция. Тер. арх. – 2000. – Т. 6. – С. 42-45.
26. Ерофеев, Н. П. Современные представления о физиологии лимфотока / Н.П. Ерофеев, Д.Б. Вчерашний // Медицина XXI век. – 2006. – Т. 3. № 4. – С. 40–43.
 27. Ершов, Ф.И. Антивирусные препараты / Ф.И. Ершов - Справочник. М., Медицина, 1998. -192с.
 28. Ершов, Ф.И. Система интерферона в норме и при патологии / Ф.И. Ершов -М.: Медицина; 1996. – 238с.
 29. Ершов, Ф.И. Антивирусные препараты (2-ое издание) / Ф.И. Ершов - М.: Гэотар-Медиа; 2006. – 311с.
 30. Ершов, Ф.И. Интерфероны и их индукторы / Ф.И. Ершов, О.И. Киселев - М.: Гэотар-Медиа; 2005. – 356с.
 31. Ершов, Ф.И. Вирусные гепатиты. Лекарственные средства, применяемые при вирусных заболеваниях / Ф.И. Ершов, М.Г. Романцов - М., - 2007. - С.84-106
 32. Жданов, Д.А. Общая анатомия и физиология лимфатической системы / Д.А. Жданов - Л.: Медгиз, 1952. – 336 с.
 33. Интерферону – 50 лет. Мат. научно-практической конференции, Россия, г. Москва, 19–20 ноября 2007 г. – М., 2007.
 34. Интерферон человека модулирует функцию инфицированного эндотелия сосудов / О.Н. Щегловитова, Н.Н. Складкина, Н.В. Болдырева и др. // Вестник РАМН. –М. -2014; -№3–4. –С. 31–35.
 35. Кадагидзе, З.Г. Цитокины // З.Г. Кадагидзе / Практическая онкология. – 2003. - Т. 4, № 3. - С. 131-139.
 36. Казмирчук, В.Е. Клиническая иммунология и аллергология./ В.Е. Казмирчук, Л.В. Ковальчук, Д.В. Мальцев - К.: Феникс, 2009. - 524 с.
 37. Кетлинский, С.А. Цитокины / С.А. Кетлинский, А.С. Симбирцев – СПб.:Фолиант. – 2008. – 552 с.
 38. Кетлинский, С.А. Эндогенные иммуномодуляторы / С.А. Кетлинский, А.С. Симбирцев, А.А. Воробьев -СПб.: Гиппократ,

1992. -256с.

39. Киселев, О.И. Интерферон-гамма: новый цитокин в клинической практике / О.И. Киселев, Ф.И. Ершов, Э.Г. Деева -СПб.: Димитрейд График Групп. 2007. -248с.
40. Лесков, В.П. Иммуностимуляторы / В.П. Лесков // Аллергия, астма и клиническая иммунология. -1999. -№ 4, -С. 12-25.
41. Лобов, Г.И. Гепарин ингибирует сокращения гладкомышечных клеток лимфатических сосудов / Г.И. Лобов, М.Н. Панькова // Бюл. экспериментальной медицины. – 2010. – Т. 149(1). – С. 4-6.
42. Лобов, Г.И. Механизмы регуляции активной транспортной функции лимфатических сосудов / Г.И. Лобов // Иммуногенез и лимфоток. – СПб.: Тр. СПбГМА, 2001. – Вып. 2. – С. 17–25.
43. Лобов, Г.И. Механизмы саморегуляции лимфангиона / Г.И. Лобов // Грудной проток и лимфатические коллекторы организма. – Л.: Тр. ЛСГМИ, 1989. – С. 61–67.
44. Лобов, Г.И. Сократительная функция лимфатических сосудов при ацидозе / Г.И. Лобов, Н.А. Кубышкина // Структурно-функциональн. основы организац. лимфат. системы. – СПб.: СПбГМА, 1998. – С. 84–86.
45. Лобов, Г.И. NO-зависимая модуляция сократительной функции гладких мышц капсулы лимфатических узлов / Г.И. Лобов, М.Н. Панькова // Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 2010. – №96(5). – С. 489-497.
46. Лобов, Г.И. Электрическая активность гладкомышечных клеток лимфатических сосудов / Г.И. Лобов // Лимфатический сосуд. – Л.: ЛСГМИ, 1984. – С.68–72.
47. Лобов, Г.И. Саморегуляция насосной функции лимфангиона / Г.И. Лобов, Р.С. Орлов // Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 1988. – Т. 74(7). – С. 977-986.
48. Лобов, Г.И. Транспорт лимфы по лимфатическим узлам: механизмы регуляции / Г.И. Лобов, М.Н. Панькова // Росс. физиол. Журн. им. И.М. Сеченова. – 2012. – Т. 98, – № 11. – С. 1350-1361.
49. Лобов, Г.И., Роль лимфатических узлов в транспорте лимфы/ Лобов Г.И., Панькова М.Н. Вестник лимфологии. -2011. -№ 3. -С. 19-24.
50. Лыков, А. П. Натуральные киллеры и гемопоэз / А.П. Лыков, В.А.

Козлов // Иммунология. -2001. - № 1. - С. 10-14.

51. Лысенко, О.В. Цитокины и sFAS-лиганд при гиперпластических процессах и полипах эндометрия / О.В. Лысенко, С.Н. Занько // Проблемы репродуктологии. – 2010. - Т.5. - С. 31-35.
52. Машковский, М.Д. Препараты, корригирующие процессы иммунитета (иммуномодуляторы, иммунокорректоры). В кн.: Лекарственные средства (Пособие для врачей). 1993, Часть II, -С. 192-209.
53. Машковский, М.Д. Лекарственные средства. Т. 2 / М.Д. Машковский -Харьков: Торсинг. Изд. 13, 1998. -560с.
54. Орлов, Р.С. Сокращения лимфатических сосудов, их регуляция и функциональная роль / Р.С. Орлов, Р.П. Борисова // Вест. АМН СССР. – 1982. – № 7. – С. 75–83.
55. Орлов, Р.С. Лимфатические сосуды. Структура и механизмы сократительной активности / Р.С. Орлов, А.В. Борисов, Р.П. Борисова. – Л. : Наука, 1983. – 254 с.
56. Особенности адренэргической иннервации лимфангиона / И.А. Булатова, Е.Я. Малафеева, Е.О. Тихановская и др. // Мат. II съезда лимфологов России, г. Санкт-Петербург, 23–25 мая 2005 г. – СПб., 2005. – С. 48–49.
57. Панькова, М.Н. Ингибиторный эффект интерлейкина-1 β на сократительную деятельность гладких мышц капсулы лимфатических узлов / М.Н. Панькова, Г.И. Лобов // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2013. – Т. 12. – № 3 (47). – С. 53-56.
58. Петренко, В.М. Сегментарная организация транспорта лимфы / В.М. Петренко // Фундаментальные исследования. – 2008. – № 12. – С. 13–16.
59. Петренко, В.М. Функциональная морфология лимфатических сосудов / В.М. Петренко. – СПб.: ДЕАН, 2008. – 400 с.
60. Рекомбинантный интерлейкин-1 β (беталейкин) в комплексной терапии неонатального сепсиса / И.А. Жаров, В.Г.Демихов, А.В.Новиков и др. // Цитокины и воспаление. – 2008. - Т.7. - С. 63-66.
61. Роль цитокинов в редокс-зависимой регуляции апоптоза / О.Е.

- Чечина, А.К. Биктасова, Е.В. Сазонова и др. // Бюллетень сибирской медицины. – 2009. - №2.- С.67-72.
62. Ронколейкин в лечении больных с гнойно-хирургической патологией предварительные результаты рандомизированных, двойных-слепых плацебо-контролируемых клинических испытаний / Н.Л. Агеев, Н.А. Шамрай, А.В. Овечкин и др. // Мед иммунология – 2001. –Т. 3. - № 2. –С. 301.
63. Сапин, М. Р. Лимфатический узел / М. Р. Сапин, Н. А. Юрина, Л. Е. Этинген. – М.: Медицина, 1978.- 271с.
64. Седов, В.И. Роль энтерококка в развитии гнойных хирургических заболеваний / В.И. Седов // Хирургия. -1983. - № 1.-С.86-88.
65. Сизова, Т.М. Статистика / Сизова Т.М. – СПб.: СПб ГУИТМО, 2005. – 80 с.
66. Симбирцев, А.С. Биология семейства интерлейкина-1 человека / А.С. Симбирцев // Иммунология. -1998. -№3. -С. 9-17
67. Симбирцев, А. С., Интерлейкин-1: от эксперимента в клинику / А.С. Симбирцев // Медицинская Иммунология. -2001.- Т.3, № 3.- С.431-438.
68. Симбирцев, А.С. Цитокины: классификация и биологические функции / А.С. Симбирцев // Цитокины и воспаление. -2004. - № 2. - С. 16-22.
69. Современные данные о структурно-функциональной организации лимфатического узла / Ю. Е. Выренков, В. К. Шишло, Ю. Г. Антропова и др. // Морфология. – 1995. – Т. 108, № 3. – С. 84–90.
70. Струкова, В.И. Острый разлитой перитонит / В.И. Струкова, Б.И. Петрова, В.С. Паукова - М.: Медицина, 1987. -С.189-192.
71. Фавстов, В.В. К вопросу о создании экспериментальной модели перитонита. / В.В. Фавстов // Актуальные проблемы внутренней медицины и стоматологии. -1997. -С.140.
72. Фрейдлин, И. С. Паракринные и аутокринные механизмы цитокиновой иммунорегуляции / И.С. Фрейдлин // Иммунология. - 2001. - № 5. - С. 4-7.
73. Функциональная организация лимфатических микрососудов брыжейки крысы / Г.Е. Бриль, Е.И. Галанжа, С.С. Ульянов и др. //

- Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. – 2001. – Т. 87, № 5. – С. 600–607.
74. Шахламов, В.А. Очерки по ультраструктурной организации сосудов лимфатической системы / В.А. Шахламов, А.П. Цамерян. – Новосибирск: Наука, 1988. – 120 с.
 75. Шпак, С.И. Влияние ингибиторов протеолиза на фагоцитарную активность цитоплазматических ферментов лейкоцитов белых мышей при стрептококковом перитонит / С.И. Шпак, В.А. Проценко, Н.И. Овчавенко // Журнал микробиол., эпидемиол. и иммунологии. -1982.-№5.-С.79-83.
 76. Ярилин, А.А. Основы иммунологии / А.А. Ярилин -М.: Медицина, 1999. – 608с.
 77. Ярилин, А. А. Система цитокинов и принципы ее функционирования в норме и при патологии / А.А. Ярилин // Иммунология. -1997. -№ 5.-С. 7-14.
 78. Aaronson, D.S. A road map for those who don't know JAK-STAT / D.S. Aaronson, C.M. Horvath // Science. – 2002. -Vol. 296, -№. 5573. -P. 1653-1655.
 79. Acton, S.E. Dendritic cells in remodeling of lymph nodes during immune responses / S.E. Acton, Reis e Sousa C. // Immunol. -2016. - Vol. 271(1). -P. 221-229.
 80. Agnes, E. Coutinho. The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights / Agnes E. Coutinho, Karen E. Chapman. // Mol Cell Endocrinol. -2011. -Vol. 335(1). –P.2–13.
 81. Alpha/ beta interferon protects adult mice from fatal sindbis virus infection and is an important determinant of cell and tissue tropism/ K.D. Ryman, W.B.Klimstra, K.B. Nguyen et al // J. Virol. - 2000. - Vol. 74. - P 3366-3378.
 82. An important role of lymphatic vessel activation in limiting acute inflammation / R. Huggenberger, S.S. Siddiqui, D. Brander et al. // Blood. – 2011. – Vol. 117, № 17. – P. 4667–4678.
 83. An indirect influence of phenylephrine on the release of endothelium-derived vasodilators in rat small mesenteric artery / K.A. Dora, J.M. Hinton, S.D. Walker et al. // British Journal of Pharmacology. – 2000. –

Vol. 129. № 2. – P. 381-387.

84. Aranow, J.S. Determinants of intestinal barrier failure in critical illness. / J.S. Aranow, M.P. Fink // *J. Anaesth.* – 1996. - Vol. 77. -№ 1. – P. 71–81.
85. Arkill, K.P. The structure and mechanical properties of collecting lymphatic vessels: an investigation using multimodal nonlinear microscopy / K.P. Arkill, J. Moger, C.P. Winlove // *J. Anat.* – 2010. – Vol. 216(5). – P. 547–555.
86. Autocrine IL-2 is required for secondary population expansion of CD8(+) memory T cells / S Feau, R Arens, S Togher, et al // *Nat Immunol.* -2011. -Vol. 12. –P. 908–913.
87. Azuma, T. Electrical activity of lymphatic smooth muscles / T. Azuma, T. Ohhashi, M. Sakaguchi // *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* – 1977. – Vol. 155(2). – P. 270–273.
88. Bazigou, E. Primary and secondary lymphatic valve development: molecular, functional and mechanical insights. / E. Bazigou, J.T. Wilson, J.E. Jr. Moore // *Microvasc. Res.* – 2014. – № 96. – P. 38–45.
89. Betterman, K.L. The lymphatic vasculature: development and role in shaping immunity/ K.L. Betterman, N.L. Harvey // *Immunol Rev.* - 2016. - Vol. 271. -№1. -P.276-92.
90. Biron, C.A. Interferons alpha and beta as immune regulators—a new look // *Immunity.* -2001. - Vol. 14. -P.661–667.
91. Bona, C. Textbook of immunology, second ed., / C. Bona, F. Bonilla – Amsterdam: Harwood Acad. Publ, 1996. – 406 p.
92. Breslin, J.W. Mechanical forces and lymphatic transport // *Microvasc Res.* -2014. - Vol. 96. –P.46-54.
93. Bridenbaugh, E.A. Lymphatic muscle: a review of contractile function / E.A. Bridenbaugh, A.A. Gashev, D.C. Zawieja // *Lymphat. Res. Biol.* – 2003. – Vol. 1, № 2. – P. 147–158.
94. Brunt, V.E. KCa channels and epoxyeicosatrienoic acids: major contributors to thermal hyperaemia in human skin / V.E. Brunt, C.T. Minson // *J Physiol.* -2012. – Vol. 590. №15. –P. 3523-3534.
95. Busillo, J.M. The five Rs of glucocorticoid action during inflammation: ready, reinforce, repress, resolve, and restore / J.M. Busillo, J.A. Cidlowski // *Trends Endocrinol Metab.* -2013. – Vol. 24. №3. –P. 109-

- 19.
96. Buttgereit, F. Rapid glucocorticoid effects on immune cells / F. Buttgereit, A. Scheffold, // *Steroids*. -2002. – Vol. 67. –P. 529–534.
 97. Ca²⁺-activated K⁺ channels mediate relaxation of forearm veins in chronic renal failure / J.B. Martinez-León, G. Segarra, P. Medina et al. // *J. Hypertens*. -2003. -Vol. 21. №10. -P. 1927-1934.
 98. Calreticulin is a receptor for nuclear export/ J.M. Holaska, B.E. Black, D.C. Love et al. // *J. Cell Biol*. -2001. – Vol.152. –P. 127–140.
 99. Casley-Smith, J.R. New trends in lymphology. Functional fine structure // *Experientia*. – 1976. – Vol. 32, № 1. – P.818–820.
 100. Casley-Smith, J.R. Protein concentrations in regions with fenestrated and continuous blood capillaries and in initial and collecting lymphatics / J.R. Casley-Smith, M.A. Sims // *Microvasc. Res*. – 1976. – Vol. 12, № 3. – P. 245–257.
 101. Characteristics of the active lymph pump in bovine prenodal mesenteric lymphatics / A.A. Gashev, W. Wang , G.A. Laine et al. // *Lymphat. Res. Biol*. – 2007. – Vol. 5, № 2. – P. 71–79.
 102. Characterization of biosynthesis and modes of action of prostaglandin E₂ and prostacyclin in guinea pig mesenteric lymphatic vessels / S. Rehal, P. Blanckaert, S. Roizes et al. // *J Pharmacol*. -2009. – Vol. 158. №8. –P. 1961-70.
 103. Chen, P.H. Cytokine Receptor Endocytosis: New Kinase Activity-Dependent and -Independent Roles of PI3K / P.H. Chen, H. Yao, L.J Huang// *Front Endocrinol (Lausanne)*. -2017. – Vol.1 №8. –P. 78.
 104. Characterization of beta-adrenoceptor subtypes and indications for two cell populations in isolated bovine mesenteric lymphatic vessels / L. Mahe , B. Chapelain , Y.M. Gargouil et al. // *Eur. J. Pharmacol*. – 1991. – Vol. 199, № 1. – P. 19–25.
 105. Clement, C.C. The lymph as a pool of self-antigens / C.C. Clement, O. Rotzschke, L. Santambrogio // *Trends Immunol*. -2011. – Vol. 32. –P. 6–11.
 106. Conduits mediate transport of low-molecular-weight antigen to lymph node follicles/ Roozendaal R., Mempel T.R., Pitcher L.A. et al. // *Immunity*. -2009. – Vol. 30. –P. 264–276.
 107. Comparison of cardiovascular effects of tiletamine-zolazepam, pentobarbital, and ketamine-xylazine in male rats / D.C. Saha, A.C. Saha, G. Malik et al. // *J Am Assoc Lab Anim Sci*. -2007. – Vol. 46.

№2. –P. 74-80.

108. Cruz-Topete, D. One Hormone Two Actions: Anti- and Pro-inflammatory Effects of Glucocorticoids / D. Cruz-Topete, J.A Cidlowski // *Neuroimmunomodulation*. –2015. – Vol. 22(0). – P. 20–32.
109. Cutolo, M. Circadian rhythms in RA / M. Cutolo, B. Seriola, C. Cravotto et al. // *Ann. Rheum. Dis*. -2003. – Vol. 62. №7. –P. 593–596.
110. Cyster, J. G. Sphingosine-1-phosphate and lymphocyte egress from lymphoid organs / J. G. Cyster, S. R. Schwab // *Annu. Rev. Immunol.* - 2012. – Vol. 30. –P. 69–94.
111. De Bosscher, K. Classic glucocorticoids versus non-steroidal glucocorticoid receptor modulators: survival of the fittest regulator of the immune system? / K. De Bosscher, I.M. Beck, G. Haegeman // *Brain Behav. Immun.* – 2010. №24. – P. 1035–1042.
112. Dejean, C. Mechanisms of action of glucocorticoids/ C. Dejean, D. Richard // *Rev Med Interne*. -2013 – Vol. 34. №5. –P. 264-268.
113. Dendritic cell function in vivo during the steady state: a role in peripheral tolerance/ R.M. Steinman, D. Hawiger, K. Liu et al. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* -2003. - Vol. 987. –P. 15–25.
114. Denninger, J.W. Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway / J.W. Denninger, M.A. Marletta // *Biochim Biophys Acta*. - 1999. -Vol.1411. №(2–3). –P. 334–350.
115. Derek, W. Cain Immune regulation by glucocorticoids / Derek W. Cain, John A. Cidlowski // *Nature Reviews Immunol.* -2017. –Vol. 17. – P.233–247.
116. Dexamethasone induces rapid promotion of norepinephrine-mediated vascular smooth muscle cell contraction /T. Zhang, W.L. Shi, J.G. Tasker et al. // *Mol Med Rep*. -2013. - Vol. 7. №2. –P. 549-54.
117. Differential effects of IFN- β on the survival and growth of human vascular smooth muscle and endothelial cells / E. Sano, S. Tashiro, K. Tsumoto et al. // *Biores. Open Access*. -2015. -Vol. 4. №1. -P.1-15.
118. Differential inhibitory actions by glucocorticoid and aspirin on cytokine-induced nitric oxide production in vascular smooth muscle cells / K. Katsuyama, M. Shichiri, H. Kato et al. // *Endocrinology*. - 1999. -Vol. 140. №5. –P. 2183-2190.
119. Dinarello, C.A. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases // *Blood*. -2011. -Vol.117. №14. –P.3720-3732.

120. Dobbins, D.E. Effects of bolus injections of leukotrienes and norepinephrine on forelimb vascular and lymphatic pressures / D.E. Dobbins, M.J. Buehn, J.M. Dabney // *Microcirc. Endothelium Lymphatics*. – 1988. – Vol. 4, № 3. – P. 249–264.
121. Doersch, K.M. The contribution of interleukin-2 to effective wound healing / K.M. Doersch, D.J.DelloStritto, M.K. Newell-Rogers // *Exp Biol Med (Maywood)*. -2017. -Vol.242. №4. –P.384-396.
122. D'Souza W.N. IL-2 is not required for the initiation of CD8 T cell cycling but sustains expansion / W.N. D'Souza, L. Lefrancois // *J. Immunol.* -2003. - Vol. 171. № 11. - P. 5727-5735.
123. Effect of interleukin 1 receptor antagonist on three types of responses to interleukin 1 in rabbit isolated blood vessels/ E. Petitclerc, S. Abel, D. deBlois et al. // *J Cardiovasc Pharmacol.* -1992. - Vol. 19. –P. 821–829.
124. Effect of vagotomy on dynamics of mesenteric lymphatic vessels in the rat / Y. Fang, Z. Ding , Y. Bi et al. // *Chin. J. Physiol.* – 2007. – Vol. 50, № 2. – P. 89–92.
125. Effects of Low-Dose Heparin Infusion on Arterial Endothelin-1 Release in Humans / P.M. Piatti, L.D. Monti, G. Valsecchi et al. // *Circulation.* – 1996. – № 94. – P. 2703–2707.
126. Efficacy of selective mineralocorticoid and glucocorticoid agonists in canine septic shock/ C.W. Hicks, D.A. Sweeney, R.L. Danner et al. // *Crit Care Med.* -2012. - Vol. 40. №1. –P.199-207.
127. Elenkov, I.J. Stress hormones, proinflammatory and antiinflammatory cytokines, and autoimmunity/ I.J. Elenkov, G.P. Chrousos // *Ann N Y Acad Sci.* -2002. - Vol. 966. –P.290-303.
128. Endothelial glucocorticoid receptor is required for protection against sepsis / J.E. Goodwin, Y. Feng, H. Velazquez et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* -2013. – Vol. 110. №1. –P. 306-311.
129. Enhanced sensitivity of trisomy 21 monocytes to the maturation-inhibiting effect of interferon / L.B. Epstein, S.H.S. Lee, C.J. Epstein // *Cell. Immunol.* -1980, – Vol. 50. -P.191-194.
130. Expression of glucocorticoid receptor alpha- and beta-isoforms in human cells and tissues / L. Pujols, J. Mullol, J. Roca-Ferrer et al. // *Am J Physiol Cell Physiol.* -2002. -Vol. 283. №4. –P. 1324-1331.
131. Evidence for a second valve system in lymphatics: endothelial

- microvalves / Ju.Trzewik, S.K. Mallipattu, G.M. Artmann et al. // *The FASEB J.* -2001. -Vol. 15. № 10. -P. 1711–1717.
132. Evidences for iNOS expression and nitric oxide production in the human macrophages / M.A. Panaro, O. Brandonisio, A. Acquafredda et al. // *Curr. Drug Targets Immune Endocr. Metabol. Disord.* -2003. -Vol. 3. №3. - P. 210-221.
133. Evidence that the ATP-induced increase in vasomotion of guinea-pig mesenteric lymphatics involves an endothelium-dependent release of thromboxane A₂ / J. Gao, J. Zhao, S.E. Rayner, et al. // *Br. J. Pharmacol.* – 1999. – Vol. 127, № 7. – P. 1597–1602.
134. Farr, A.G. The structure of the sinus wall of the lymph node relative to its endocytic properties and transmural cell passage / A.G. Farr, Y. Cho, P.P. De Bruyn // *Am. J. Pharmacol.* – 2002. -Vol.136. №8. – P. 1210-1218.
135. Félétou, M. Tranilast increases vasodilator response to acetylcholine in rat mesenteric resistance arteries through increased EDHF participation / M. Félétou, P.M. Vanhoutte // *Clin Sci (Lond).* -2009. –Vol. 117. №4. –P.139-155.
136. Ferguson, M.K. Nitric oxide and endothelium-dependent relaxation in tracheobronchial lymph vessels / M.K. Ferguson, V.J.DeFilippi // *Microvasc Res.* -1994. – Vol. 47. №3. –P.308-317.
137. Fitzpatrick, F.A. Virus and interferon effects on cellular prostaglandin biosynthesis / F.A. Fitzpatrick, D.A. Stringfellow // *J. Immunol.* -1980. – Vol. 125. №1. –P. 431-437.
138. Gaffen, S.L. Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications / S.L. Gaffen, K.D. Liu // *Cytokine.* -2004. 28. №3. –P. 109-123.
139. Galliher-Beckley, A.J. Ligand-independent phosphorylation of the glucocorticoid receptor integrates cellular stress pathways with nuclear receptor signaling / A.J. Galliher-Beckley, J.G.Williams, J.A. Cidlowski // *Mol Cell Biol.* -2011. – Vol. 31/ №23. –P.4663-4675.
140. Gashev, A.A. Inhibition of the active lymph pump by flow in rat mesenteric lymphatics and thoracic duct / A.A. Gashev, M.J. Davis, D.C. Zawieja // *J. Physiol.* – 2002. – Vol. 540. №3. – P. 1023–1037.

141. Gasheva, O.Y. Contraction-initiated NO-dependent lymphatic relaxation: a self-regulatory mechanism in rat thoracic duct / O.Y. Gasheva, A.A. Gashev, D.C. Zawieja // *J. Physiol.* – 2006. – Vol. 575, №. 3. – P. 821–832.
142. Gasteiger, G. Lymph node - an organ for T-cell activation and pathogen defense / G. Gasteiger, M. Ataide, W. Kastenmüller // *Immunol Rev.* - 2016. -Vol. 271. №1. –P. 200-220.
143. Glucocorticoid and cytokine crosstalk: Feedback, feedforward, and co-regulatory interactions determine repression or resistance / R. Newton, S. Shah, Mohammed O. et al. // *J Biol Chem.* -2017. -Vol. 292. №17. – P. 7163–7172.
144. Glucocorticoid therapy for immune-mediated diseases: basic and clinical correlates / D.T. Boumpas, G.P. Chrousos, R.L. Wilder et al. // *Annals of internal medicine.* – 1993. -Vol. 119. №12. - P. 1198-1208.
145. Grbesa, I. Genomic effects of glucocorticoids/ I. Grbesa, O. Hakim // *Protoplasma.* -2017. -Vol. 254. №3. –P.1175-1185.
146. Gretz, J.E. Cords, channels, corridors and conduits: critical architectural elements facilitating cell interactions in the lymph node cortex / J.E. Gretz, A.O. Anderson, S. Shaw // *Immunol Rev.* – 1997. -Vol.156. –P. 11-24.
147. Grigorova, I.L. Lymph node cortical sinus organization and relationship to lymphocyte egress dynamics and antigen exposure / I.L. Grigorova, M. Pantelev, J.G. Cyster // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* -2010. - Vol.107. №47. –P. 20447-20452.
148. Hashimoto, S. Effects of vasoactive substances on the pig isolated hepatic lymph vessels / S. Hashimoto, Y. Kawai, T. Ohhashi // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 1994. – Vol. 269, № 2. – P. 482–488.
149. Hecker, M. Regulation of inducible nitric oxide synthase gene expression in vascular smooth muscle cells / M. Hecker, M.Cattaruzza, A.H. Wagner // *Gen Pharmacol.* -1999. -Vol. 32. №1. –P. 9-16.
150. Heparin regulates endothelin production through endothelium-derived nitric oxide in human endothelial cells / K. Yokokawa, H. Tahara, M. Kohno et al. // *J. Clin. Invest.* – 1993. – Vol. 2, № 4. – P. 2080–2085.
151. Heppell, C.A Model for interstitial drainage through a sliding lymphatic valve / C. Heppell, T. Roose , G. Richardson // *Bull. Math. Biol.* – 2015. -Vol. 77. №6. –P.1101–1131.
152. High-dose heparin decreases nitric oxide production by cultured bovine endothelial cells / G.R. Upchurch, G.N. Welch , J.E. Freedman et al. //

- Circulation. – 1997. – Vol. 95, № 8. – P. 2115–2121.
153. Hood, J.L. The association of exosomes with lymph nodes // *Semin Cell Dev Biol.* -2017. – Vol. 67. –P. 29-38.
154. Huang, A.H. Endothelium-dependent hyperpolarization of smooth muscle cells in rabbit femoral arteries is not mediated by EDRF (nitric oxide) / A.H. Huang, R. Busse, E. Bassenge // *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* – 1988. – Vol. 338, №4. – P. 438 – 442.
155. Human thoracic duct in vitro: diameter-tension properties, spontaneous and evoked contractile activity / N. Telinius, N. Drewsen, H. Pilegaard et al. // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2010. – Vol. 299, № 3. – P. 811–881.
156. Hu, X.Q. Function and regulation of large conductance Ca(2+)-activated K⁺ channel in vascular smooth muscle cells / X.Q. Hu, L. Zhang // *Drug Discov Today.* -2012. – Vol. 17. №17-18. –P. 974-987.
157. Hydrogen sulfide activates Ca²⁺ sparks to induce cerebral arteriole dilatation / G.H. Liang, Q. Xi, C.W. Leffler et al. // *J Physiol.* -2012. – Vol. 590. №11. –P. 2709-2720.
158. Identification of a cytotoxic form of dimeric interleukin-2 in murine tissues / L.E. Wrenshall, S.E. Clabaugh, D.R. Cool et al. // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9. №7. –P.e102191.
159. Ignarro, L.J. Nitric oxide: a unique endogenous signaling molecule in vascular biology / *Biosci Rep.* -1999. №19. –P.51–71.
160. IL-1 and related cytokines enhance thrombin-stimulated PGI₂ production in cultured endothelial cells without affecting thrombin-stimulated von Willebrand factor secretion or platelet-activating factor biosynthesis / G.B. Zavoico, B.M. Ewenstein, A.I. Schafer et al. // *J. Immunol.* – 1989. – Vol. 142, № 11. – P. 3993–3999.
161. Immunosuppressive therapy for active lymphocytic myocarditis: virological and immunologic profile of responders versus nonresponders/ A. Frustaci, C.Chimenti, F.Calabrese et al. // *Circulation.* -2003. -Vol. 107. №6. –P. 73-78.
162. Impaired antiviral response and alpha/beta interferon induction in mice lacking beta interferon / R. Deonarain, A. Alcami, M. Alexiou et al. // *Virology.* -2000. -Vol. 74. - P. 3404-3409.

163. Impaired humoral immunity and tolerance in K14-VEGFR-3-Ig mice that lack dermal lymphatic drainage. / S.N. Thomas, J.M. Rutkowski, M. Pasquier et al. // *Immunol.* – 2012. №189. –P. 2181–2190.
164. Increased systemic inflammation after laparotomy versus laparoscopy in an animal model of peritonitis / C.A. Jacobi, J. Ordemann, H.U. Zieren et al. // *Arch. Surg.* – 1998. - Vol. 133. - P.258-264.
165. Independent and interactive effects of preload and afterload on the pump function of the isolated lymphangion / J.P. Scallan, J.H. Wolpers, M. Muthuchamy et al. // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* -2012. - Vol. 303. №7. –P. H809–H824.
166. Induction of IL-2 receptor expression in vivo. Response to allogeneic cells / R.A. Kroczek, C.D. Black, J. Barbet et al. // *Transplantation.* - 1987. Vol. 44. - № 4. - P. 547-553.
167. Infection, immunity and the neuroendocrine response / P. Borghetti, R. Saleri, E. Mocchegiani et al. // *Vet. Immunol. Immunopathol.* – 2009. № 130(3-4). -P. 141-162.
168. Inflammation induces lymphangiogenesis through up-regulation of VEGFR-3 mediated by NF- κ B and Prox1. / M.J. Flister, A. Wilber, K.L.Hall et al. // *Blood.* -2010. №115. –P. 418–429.
169. Intralymphatic CCL21 Promotes Tissue Egress of Dendritic Cells through Afferent Lymphatic Vessels / E. Russo, A. Teijeira, K. Vaahtomeri et al. // *Cell Rep.* -2016. – Vol. 14. №7. –P. 1723-1734.
170. Intrinsic increase in lymphangion muscle contractility in response to elevated afterload / M.J. Davis, J.P. Scallan, J.H. Wolpers et al. // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* -2012; - Vol. 303. –P. H795–808.
171. Investigation of the prostacyclin (IP) receptor antagonist RO1138452 on isolated blood vessel and platelet preparations / R.L. Jones, H.Wise, R. Clark et al.// *Br. J. Pharmacol.* – 2006. – Vol. 149. №1. –P.110-120.
172. In vitro induction of the expression of the multiple IgA isotypes genes in rabbit B cells by TGF-beta and IL-2 / H. Spieker-Polet, Yam P-C., Z. Arbieva et al. // *J.Immunol.* -1999. -Vol. 162/ -P. 5380-5388.
173. Johnston, M.G. Effects of arachidonic acid and its cyclo-oxygenase and lipoxygenase products on lymphatic vessel contractility in vitro / M.G. Johnston , A. Kanalec, J.L. Gordon // *Prostaglandins.* – 1983. – Vol. 25, № 1. – P. 85–98.
174. Johnston, M.G. Suppression of lymphatic vessel contractility with

- inhibitors of arachidonic acid metabolism / M.G. Johnston, C. Feuer // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 1983. – Vol. 226, № 2. – P. 603–607.
175. Kawade, J. Characterization of mouse interferon molecules// Humoral factors in host defense. New York. -1983. –P. 175-189.
176. Kirkpatrick, C. T. Electrical and mechanical activity of isolated lymphatic vessels / C. T. Kirkpatrick, N. G. McHale // *J. Physiol.* -1977. -№ 272. - P. 33–34.
177. Kimmoun, A. Mechanisms of vascular hyporesponsiveness in septic shock / A. Kimmoun, N. Ducrocq, B. Levy // *Curr. Vasc. Pharmacol.* - 2013. -Vol. 11. №2. –P. 139-149.
178. Kholová, I. Lymphatic system: morphology and pathology update // *Cesk. Patol.* – 2010. – Vol. 46, № 4. – P. 98–103.
179. Kolyada, A.Y. Transcriptional regulation of the human iNOS gene by IL-1beta in endothelial cells / A.Y. Kolyada, N.E. Madias // *Mol. Med.*- 2001. №7. –P.329 – 343.
180. Kuka, M. The role of lymph node sinus macrophages in host defense / M. Kuka, M. Iannacone // *Ann N Y Acad Sci.* -2014. №1319. –P. 38–46.
181. Kumar, R. Gene regulation by the glucocorticoid receptor: structure: function relationship / R.Kumar, E. B. Thompson // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* -2005. – Vol. 94. –P. 383–394.
182. Kvetnansky, R. Stress-triggered changes in peripheral catecholaminergic systems / R. Kvetnansky, X. Lu, M.G. Ziegler // *Adv Pharmacol.* -2013/ №68. –P. 359-397.
183. Leon, M.L. Gamma interferon: a central mediator in atherosclerosis / M.L. Leon, S.H. Zuckerman // *Inflamm Res.* -2005. -Vol. 54. №10. – P.395-411.
184. Liao, S. Lymphatic system: An active pathway for immune protection / S. Liao, P.Y. von der Weid // *Seminars in Cell & Developmental Biology.* -2015. №38. –P.83-89.
185. Lipopolysaccharide-induced impairment of nitric oxide-mediated vasorelaxation and protective effects of nitric oxide synthesis inhibitors in isolated rat mesenteric arteries / T. Miike, M. Kanda, K. Kunishiro et al. // *Arzneimittelforschung.* -2010. – Vol. 60. №6. –P. 315-319.
186. Lymphokine-activated killer (LAK) cells modulate the effects of IL-2

- on a T cell-mediated immune response / P. McCulloch, G. Gallagher, L.P. Walsh et al. // *Clin. Exp. Immunol.* -1991. - Vol. 85. № 3. - P. 519-524.
187. Lymphangion coordination minimally affects mean flow in lymphatic vessels / A.M. Venugopal, R.H. Stewart, G.A. Laine et al. // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2007. – Vol. 293, № 2. – P. 1183–1189.
188. Lymphatic drainage efficiency: a new parameter of lymphatic function / G. Keramida, E. Wroe, N. Winterman et al. // *Acta Radiol.* -2018. - Vol. 59. №9. –P. 1097-1101.
189. Lymphatic pumping: mechanics, mechanisms and malfunction / J.P. Scallan, S.D. Zawieja, J.A. Castorena-Gonzalez et al. // *J Physiol.* - 2016. – Vol. 594. №20. –P. 5749-5768.
190. Mawhinney, H.J. Spontaneous activity in isolated bovine mesenteric lymphatics / H.J. Mawhinney, I.C. Roddie // *J. Physiol.* – 1973. – Vol. 229, № 2. – P. 339–348.
191. Mawhinney, J.A. Evidence for alpha-adrenergic innervation of the isolated canine thoracic duct / J.A. Mawhinney, K. Zimmerman, W.F. Middendorf // *J. Appl Physiol.* – 1980. – Vol. 49, № 6. – P. 1010–1015.
192. McHale, N.G. Lymphatic innervations / N.G. McHale // *Blood Vessels.* – 1990. – Vol. 27, № 2–5. – P. 127–136.
193. McHale, N.G. Nervous modulation of spontaneous contractions in bovine mesenteric lymphatics / N.G. McHale, I.C. Roddie, K.D. Thornbury // *J. Physiol.* – 1980. – Vol. 309. – P. 461–472.
194. Memory B cells are reactivated in subcapsular proliferative foci of lymph nodes / I. Moran, A. Nguyen, W.H. Khoo et al. // *Nat Commun.* - 2018. – Vol.9. №1. –P. 3372.
195. Micro- and Macro Circulatory Changes During Sepsis and Septic Shock in a Rat Model / T. Hua, X. Wu, W. Wang et al. // *Shock.* -2017. Jul 20. doi: 10.1097/SHK.0000000000000954.
196. Miles, A. Pufall. Glucocorticoids and Cancer // *Adv Exp Med Biol.* - 2015. №872. –P. 315–333.
197. Mizuno, R. Regulation of the vasomotor activity of lymph microvessels by nitric oxide and prostaglandins / R. Mizuno, A. Koller, G. Kaley // *Am. J. Physiol.* – 1998. – Vol. 274, № 3 (2). – P. 790–796.
198. Monet, M. Involvement of phosphoinositide 3-kinase and PTEN protein in mechanism of activation of RPC6 protein in vascular smooth muscle cells / M. Monet, N. Francoeur, G. Boulay // *J Biol Chem.* -2012. – Vol.

287. №21. –P. 17672-17681.
199. Moore, JE Jr. Lymphatic System Flows / JE Jr Moore, C.D. Bertram // *Annu Rev Fluid Mech.* -2018. №50. –P. 459-482.
200. Myogenic constriction and dilation of isolated lymphatic vessels / M.J. Davis , A.M. Davis , C.W. Ku et al. // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2009. – Vol. 296, № 2. – P. 293–302.
201. Muthuchamy, M. Molecular regulation of lymphatic contractility / M. Muthuchamy, D. Zawieja // *Ann N Y Acad Sci.* -2008. №1131. –P. 89-99.
202. Natural and synthetic corticosteroids inhibit uptake 2-mediated transport in CNS neurons / J.E. Hill, K. Makky, L. Shrestha et al. // *Physiol Behav.* -2011. – Vol. 104. №2. –P. 306-11.
203. NetPath: a public resource of curated signal transduction pathways / K. Kandasamy, S.S. Mohan, R. Raju et al. // *Genome Biology.* -2010. - Vol. 11. №1. –P. R3.
204. New molecular mechanisms for cardiovascular disease: contribution of endothelium-derived hyperpolarizing factor in the regulation of vasoconstriction in peripheral resistance arteries / Jin X., Satoh-Otonashi Y., Zamami Y., et al. // *J. Pharmacol. Sci.* -2011. -Vol. 116, № 4. –P.332-336.
205. Nitric oxide synthase isoforms expression in fibroblasts isolated from human normal peritoneum and adhesion tissues / Z.L. Jiang, X. Zhu, M.P. Diamond et al. // *Fertil. Steril.* -2008. – Vol. 90. №3. –P.769-774.
206. Neuroendocrine Control of Macrophage Development and Function / A.D. Jurberg, V. Cotta-de-Almeida, J.R. Temerozo et al. // *Front Immunol.* -2018. №9. –P. 1440.
207. New insights into the intracellular mechanisms by which PGI₂ analogues elicit vascular relaxation: cyclic AMP-independent, Gs-protein mediated-activation of Maxi K channel / Y. Tanaka, F. Yamaki, K. Koike et al. // *Curr. Med. Chem. Cardiovasc. Hematol. Agents.* – 2004. – Vol. 2, № 3. – P. 257–265.
208. Non-genomic effect of glucocorticoids on cardiovascular system/ S.R. Lee, H.K. Kim, J.B. Youm et al.// *Pflugers Arch.* -2012. – Vol. 464 №6. –P. 549-559.
209. Nongenomic steroid action: controversies, questions, and answers / R.M. Losel, E. Falkenstein, M. Feuring et al. // *Physiol. Rev.* -2003.

- №83. –P. 965–1016.
210. Oakley, R. H. Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: new mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids / R.H. Oakley, J.A. Cidlowski // *J. Biol. Chem.* -2011. №286. –P. 3177–3184.
 211. Ohhashi, T. Sympathetic effects on spontaneous activity in bovine mesenteric lymphatics / T. Ohhashi, T. Azuma // *Am. J. Physiol.* – 1984. – Vol. 247, № 4 (2). – P. 610–615.
 212. Ohhashi, T. Active and passive mechanical characteristics of bovine mesenteric lymphatics / T. Ohhashi, T. Azuma, M. Sakaguchi // *Am. J. Physiol.* – 1980. – Vol. 239, № 1. – P. 88–95.
 213. Ohhashi, T. The response of lymphatic smooth muscles to vasoactive substances / T. Ohhashi, Y. Kawai, T. Azuma // *Pflugers Arch.* – 1983. – Vol. 342. – P. 217–227.
 214. Ohhashi, T. Acetylcholine-induced release of endothelium-derived relaxing factor from lymphatic endothelial cells / T. Ohhashi, N. Takahashi // *Am. J. Physiol.* – 1991. – Vol. 260, № 4 (2). – P. 1172–1178.
 215. Ohtani, O. Structure and function of rat lymph nodes /O. Ohtani, Y. Ohtani // *Arch. Histol. Cytol.* – 2008. –Vol. 71, №2. – P. 69–76.
 216. Parkington, H.C. Role of membrane potential in endotheliumdependent relaxation of guinea-pig coronary arterial smooth muscle / H.C. Parkington, M.A. Tonta, H.A. Coleman, M. Tare // *J Physiol.* – 1995. – Vol. 484. – P. 469 – 480.
 217. Pathophysiology of glucocorticoid signaling / G. Vitellius, S. Trabado, J. Bouligand et al. // *Ann Endocrinol (Paris)*. -2018. –Vol. 79. №3. –P. 98-106.
 218. Pegylated-Interferon alpha therapy for treatment-experienced chronic hepatitis B patients / M.L.Yeh, C.Y. Peng, C.Y. Dai et al. // *PLoS ONE*. -2015. -Vol.10. №4. –P.e0122259.
 219. Pegylated Interferon mono-therapy of chronic hepatitis C in the dialysis population: systematic review and meta-analysis / F. Fabrizi, V.Dixit, P. Messa et al. // *Ther. Apher. Dial.* -2015. -Vol. 19. №6. -P. 611-621.
 220. Perioperative lavage promotes intraperitoneal adhesion in the rat / M.Van Westreenen, P.M. van den Tol, A. Pronk et al. // *Eur. Surg. Res.* - 1999. - Vol. 31. -P. 196-201.

221. Phasic contractions of rat mesenteric lymphatics increase basal and phasic nitric oxide generation in vivo / H.G. Bohlen, W. Wang, A. Gashev et al // *Am J Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2009. – Vol. 297, №4. – P. 1319–1328.
222. Pitha, P.M. Effect of interferon on exogenous, endogenous and chronic murine leukemia virus infection / P. M. Pitha, W.P. Rowe, M.N. Oxman // *Virology.* -1976. №70. –P. 324-338.
223. Platt, A.M. Dendritic cell migration through the lymphatic vasculature to lymph nodes / A.M. Platt, G.J. Randolph // *Adv Immunol.* -2013. №120. –P. 51–68.
224. Poudrier, J. CD54/intercellular adhesion molecule 1 and major histocompatibility complex II signaling induces B cells to express interleukin 2 receptors and complements help provided through CD40 ligation / J. Poudrier, T. Owens // *J Exp Med.* -1994. №179. –P. 1417–1427.
225. Proliferation, differentiation and cytokine secretion of human umbilical cord blood-derived mononuclear cells in vitro / S. Neuhoff, J. Moers, M. Rieks et al. // *Experimental Hematology.* -2007. - Vol. 35. - P. 1119-1131.
226. Quan, A. Endothelium-independent flow-induced dilation in the mouse carotid artery / A. Quan, M.E. Ward, S. Kulandavelu, S.L. et al. // *J Vasc Res.* -2006. –Vol. 43. №4. –P.383-391.
227. Rahbar, E. A model of a radially expanding and contracting lymphangion / E. Rahbar, J.E. Moore Jr. // *J. Biomech.* – 2011. – Vol. 44, № 5. – P. 1001–1007.
228. Rapid permissive action of dexamethasone on the regulation of blood pressure in a rat model of septic shock / W.L. Shi, T. Zhang, J.R. Zhou et al. // *Biomed. Pharmacother.* -2016. №84. –P. 1119-1125.
229. Reduced effects of endothelium-derived hyperpolarizing factor in ocular ciliary arteries from spontaneous hypertensive rats / Y. Dong, H. Watabe, J. Cui et al. // *Exp. Eye Res.* – 2010. – Vol. 90, №2. – P. 324-329.
230. Reduced neutrophil sequestration in lung tissue after laparoscopic lavage in a rat peritonitis model / M. Pross, R. Mantke, D. Kunz et al. // *World J. Surg.* - 2002. – Vol. 26, №1. – P. 49-53.
231. Reeder, L.B. Modulation of lymphatic spontaneous contractions by EDRF / L.B. Reeder, L.H. Yang, M.K. Ferguson // *J. Surg. Res.* – 1994.

– Vol. 56, № 6. – P. 620–625.

232. Regulation of cytokine-inducible nitric oxide synthase in cardiac myocytes and microvascular endothelial cells. Role of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1/ERK2) and STAT1 alpha / K. Singh, J.L. Balligand, T.A. Fischer et al. // *J. Biol. Chem.* -1996. №271. –P. 1111 – 1117.
233. Regulation of lymph node vascular growth by dendritic cells / B. Webster, E.H. Eklund, L.M. Agle et al. // *J. Exp. Med.* -2006. №203. – P. 1903–1913.
234. Regulation of smooth muscle by inducible nitric oxide synthase and NADPH oxidase in vascular proliferative diseases / R. Ginnan, B.J. Guikema, K.E. Halligan et al.// *Free Radic. Biol. Med.* – 2008. – Vol. 44. №7. - P.1232-1245.
235. Rehal, S. Experimental ileitis alters prostaglandin biosynthesis in mesenteric lymphatic and blood vessels / S. Rehal, P.Y. von der Weid // *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* -2015. №116-117. –P. 37-48.
236. Role of nuclear factor-kappaB activation in cytokine- and sphingomyelinase-stimulated inducible nitric oxide synthase gene expression in vascular smooth muscle cells / K. Katsuyama, M. Shichiri, F. Marumo et al. // *Endocrinology.* -1998. – Vol. 139. №11. –P. 4506-4512.
237. Role of nitric oxide and other endothelium-derived factors / E. Stankevicius, E. Kevelaitis, E. Vainorius et al. // *Medicina (Kaunas).* – 2003. – Vol. 39, № 4. – P. 333–341.
238. Rovenská, E. Structure and function of lymphatic capillaries in synovial joint. / E. Rovenská, J. Rovenský // *Cas. Lek. Cesk.* – 2012.– №151(11). – P. 520–522.
239. Sakai, H. Effects of endothelin on spontaneous contractions in lymph vessels / H. Sakai, F. Ikomi, T. Ohhashi // *Am. J. Physiol.* – 1999. – P. 459–466.
240. Sincovics, J.G. Oncogenes and growth factors//*Critical Rev. Immunol.*-1988.-Vol.8. №4. -P.217-299.
241. Samuel, C.E. Antiviral actions of interferons // *Clin. Microbiol. Rev.* - 2001. – Vol. 14. №4. –P. 778–809.
242. Social disruption, immunity, and susceptibility to viral infection. Role

- of glucocorticoid insensitivity and NGF / J.F. Sheridan, J.L. Stark, R. Avitsur et al. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* -2000. № 917. –P. 894-905.
243. Spolski, R. Biology and regulation of IL-2: from molecular mechanisms to human therapy / R. Spolski, P. Li, W.J. Leonard // *Nat Rev Immunol.* -2018. –Vol. 18. №10. –P. 648-659.
244. Stahn, C. Genomic and nongenomic effects of glucocorticoids / C. Stahn, F. Buttgerit // *Nat Clin Pract Rheumatol.* -2008. –Vol.4. №10. –P. 525-33.
245. Shimokawa, H. Hydrogen peroxide as an endothelium-derived hyperpolarizing factor // *Pflugers Arch.* -2010. – Vol. 459. №6. –P. 915-922.
246. Shimura, N. Effects of low-dose-gamma rays on the immune system of different animal models of disease / N. Shimura, S. Kojima // *Dose Response.* -2014. – Vol. 12. №3. –P. 429-465.
247. Subcapsular sinus macrophages in lymph nodes clear lymph-borne viruses and present them to antiviral B cells / T. Junt, E.A. Moseman, M. Iannacone et al. // *Nature.* -2007. №450. –P. 110–114.
248. Subcapsular sinus macrophages promote NK cell accumulation and activation in response to lymph-borne viral particles / Z. Garcia, F. Lemaître, N. van Rooijen et al. // *Blood.* -2012. –Vol. 120. №24. –P. 4744-4750.
249. Subendothelial nerve fibers in bovine mesenteric lymphatics: an ultrastructural and immunohistochemical study / G. Sacchi, E. Weber, M. Aglianó et al. // *Lymphology.* – 1994. – Vol. 27, № 2. – P. 90–96.
250. Suppression of GATA-3 nuclear import and phosphorylation: a novel mechanism of corticosteroid action in allergic disease / K. Maneechotesuwan, X. Yao, K. Ito et al. // *PLoS Med.* -2009. – Vol. 6. №5. –P. e1000076.
251. Takahashi, N. Effects of vasoconstrictive and vasodilative agents on lymphatic smooth muscles in isolated canine thoracic ducts / N. Takahashi, Y. Kawai, T. Ohhashi // *J. Pharmacol Exp. Ther.* – 1990. – Vol. 254, № 1. – P. 165–170.
252. The antiviral response to gamma interferon / A.P. Costa-Pereira, T.M. Williams, B. Strobl et al. // *J. Virol.* -2002. – Vol. 76 №18. –P. 9060–

9068.

253. The effects of dexamethasone and L-NAME on acute lung injury in rats with lung contusion / A. Kozan, N. Kilic, H. Alacam et al. // *Inflammation*. -2016. – Vol. 39. №5. –P. 1747-1756.
254. The effect of PI3 kinase inhibitor LY294002 on voltage-dependent K⁽⁺⁾ channels in rabbit coronary arterial smooth muscle cells / D.H. Hong, I.W. Choi, Y.K. Son et al. // *Life Sci*. -2013. -Vol. 92. №17-19. –P. 916-922.
255. The effects of interferon- β on interleukin-10 in multiple sclerosis patients / E. Ersoy, C.N.S. Kuş, U. Şener et al. // *European Journal of Neurology*. -2005. – Vol. 12. №3. –P. 208–211.
256. The kaleidoscope of glucocorticoid effects on immune system / M. Zen, M. Canova, C. Campana et al. // *Autoimmun Rev*. – 2011. –Vol. 10. №6. –P. 305-310.
257. The mechanism by which RhoA regulates vascular reactivity after hemorrhagic shock in rats / T. Li, Y. Fang, G. Yang et al. // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. -2010. – Vol. 299. №2. –P. H292-H299.
258. The interactome of the glucocorticoid receptor and its influence on the actions of glucocorticoids in combatting inflammatory and infectious diseases / I. Petta, L. Dejager, M. Ballegeer et al. // *Microbiol Mol Biol Rev*. -2016. №80. –P. 495–522.
259. The role of the interleukin-1 family in trained immunity / SJCFCM Moorlag, R.J. Röring, LAB Joosten et al. // *Immunol Rev*. -2018. – Vol. 281. №1. –P. 28-39.
260. The interleukin-1 receptor antagonist anakinra improves endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats / S. Vallejo, E. Palacios, T. Romacho et al. // *Cardiovasc Diabetol*. -2014. – Vol. 13. №1. –P.158.
261. The interferons. Mechanisms of action and clinical applications/ S. Baron, S.K. Turing, W.K. Fleischman et al. // *Energ. Sante/Serv.etud.med.*- 1992. №3. –P. 362-363.
262. The involvement of glucocorticoids in psychological stress-induced exacerbations of experimental allergic asthma / K. Okuyama, K.

- Dobashi, T. Miyasaka et al. // *Int. Arch. Allergy Immunol.* -2014. - Vol.163. №4. –P. 297-306.
263. The lymphatic system: integral roles in immunity / G.J. Randolph, S. Ivanov, B.H. Zinselmeyer et al. // *Annu Rev Immunol.* -2017. №35. –P. 31-52.
264. Timothy P. Padera Lymphatic function and immune regulation in health and disease / Timothy P. Padera, PhD, // *Lymphat Res Biol.* -2013. - Vol. 11. №3. –P. 136–143.
265. Transient expression of IL-2 receptor precedes the differentiation of immature thymocytes / R.P. Shimonkevitz, L.A. Husmann, M.J. Bevan et al. // *Nature.* -1987. -Vol.392. №6135. –P. 157-159.
266. TRPV4 (transient receptor potential vanilloid 4) channel-dependent negative feedback mechanism regulates Gq protein-coupled receptor-induced vasoconstriction / K. Hong, E.L. Cope, L.J. DeLalio et al. // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* – 2018. – Vol.38. № 3. – P. 542-554.
267. Tsunemoto, H. Flow-mediated release of nitric oxide from lymphatic endothelial cells of pressurized canine thoracic duct / H. Tsunemoto, F. Ikomi, T. Ohhashi // *Jpn. J. Physiol.* – 2003. – Vol. 53, № 3. – P. 157–163.
268. Van Helden, D.F. Pacemaker potentials in lymphatic smooth muscle of the guinea-pig mesentery // *J. Physiol.* – 1993. – Vol. 471. – P. 465–479.
269. Vanhoutte, P.M. Regeneration of the endothelium in vascular injury / P.M. Vanhoutte // *Cardiovasc. Drugs Ther.* – 2010. – Vol. 24(4). – P. 299–303.
270. Vanhoutte, P.M. Endothelial dysfunction: the first step toward coronary arteriosclerosis / P.M. Vanhoutte // *Circ J.* – 2009. – Vol. 73, №4.– P. 595 – 601.
271. Vascular smooth muscle contractility assays for inflammatory and immunological mediators / F. Marceau, D. deBlois, E. Petitclerc et al. // *Int Immunopharmacol.* -2010. – Vol. 10. №11. –P. 1344-53.
272. Von der Weid, P.Y. Functional electrical properties of the endothelium in lymphatic vessels of the guinea-pig mesentery / P.Y. von der Weid, D.F. van Helden // *J. Physiol.* – 1997. – Vol. 504 (2). – P. 439–451.

273. Von der Weid, P.Y. Lymphatic smooth muscle: the motor unit of lymph drainage / P.Y. von der Weid, D.C. Zawieja // *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* – 2004. – Vol. 36, № 7. – P. 1147–1153.
274. Von der Weid, P.Y. Endothelium-dependent modulation of pacemaking in lymphatic vessels of the guinea-pig mesentery / P.Y. von der Weid, M.J. Crowe, D.F. van Helden // *J. Physiol.* – 1996. – Vol. 493 (2). – P. 563–575.
275. Ward, P.A. A historical perspective on sepsis / P.A. Ward, M. Bosmann // *Am. J. Pathol.* -2012. –Vol. 181 №1. –P. 2–7.
276. Wilting, J. The lymphatic vascular system: secondary or primary? / J. Wilting, M. Papoutsis, J. Becker // *Lymphology.* – 2004. – Vol. 37, № 3. – P. 98–106.
277. Wu, K.K. Cellular and molecular biology of prostacyclin synthase / K.K. Wu, J.Y. Liou // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2005. – Vol. 338, №1. – P. 45 – 52.
278. What's where and why at a vascular myoendothelial microdomain signaling complex / S.L. Sandow, R.E. Haddock, C.E. Hill et al. // *Clinical and Experim.l Pharmacol. and Physiol.* – 2009. – Vol. 36. № 1. – P. 67-76.
279. Yokoyama, S. Effects of acetylcholine on spontaneous contractions in isolated bovine mesenteric lymphatics / S. Yokoyama, T. Ohhashi // *Am. J. Physiol.* – 1993. – Vol. 264, №5 (2). – P. 1460–1464.
280. Zawieja, D.C. Coordination of lymphangion contractile activity / D.C. Zawieja, K.L. Davis, H.J. Greger // *FASEB J.* – 1989. – Vol. 3, № 3. – P. 271.
281. Zawieja, D.C. Axial distribution of contractile forces in rat mesenteric lymphatics / D.C. Zawieja, W.M. Hinds, H.J. Greger // *FASEB J.* – 1990. – Vol. 4, № 4. – P. 1278.
282. Zawieja, D.C. Lymphatic biology and the microcirculation: past, present and future / D. Zawieja // *Microcirculation.* – 2005. – Vol. 12, № 1. – P. 141–150.
283. Zawieja, D.C. Contractile physiology of lymphatics / *Res. Biol.*- 2009. –Vol. 7. №2. –P. 87-96.
284. Zhang, J. The role of the microlymphatic valve in the propagation of spontaneous rhythmical lymphatic motion in rat / J. Zhang, H. Li, R. Xiu // *Clin. Hemorheol. Microcirc.* – 2000. – Vol. 23, № 2–4. –P. 349–353.

285. Zhang, R.Z. Length-tension relationships of small arteries, veins, and lymphatics from the rat mesenteric microcirculation / R.Z. Zhang, A.A. Gashev, D.C. Zawieja // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2007. – Vol. 292(4). – P. 1943–1952.
286. Zhao, J. ATP-induced endothelium-independent enhancement of lymphatic vasomotion in guinea-pig mesentery involves P2X and P2Y receptors / J. Zhao, D.F. van Helden // *Br. J. Pharmacol.* – 2002. – Vol. 137, № 4. – P. 477–487. 301. Zhao, J. ET-1-associated vasomotion and vasospasm in lymphatic vessels of the guinea-pig mesentery / J. Zhao, D.F. van Helden // *Br. J. Pharmacol.* – 2003. – Vol. 140, № 8. – P. 1399–1413.
287. Zhao, J. ET-1-associated vasomotion and vasospasm in lymphatic vessels of the guinea-pig mesentery / J. Zhao, D.F. van Helden // *Br. J. Pharmacol.* – 2003. – Vol. 140, № 8. – P. 1399–1413.

СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АКТГ	адренокортикотропный гормон
ГК	глюкокортикоиды
ГМК	гладкомышечная клетка
ЛС	лимфатический сосуд
ЛПС	липополисахарид
ЛУ	лимфатический узел
ТЭА	тетраэтиламмония хлорид
СОХ	циклоксигеназа
EDHF	эндотелиальный гиперполяризующий фактор
IFN	интерферон
iNOS	индуцибельная NO-синтаза
IL	интерлейкин
IP3	инозитолтрифосфат
NK-клетки	натуральные киллеры
NO	оксид азота
PGI ₂ ,	простациклин