

Министерство образования и науки Российской Федерации  
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
Петрозаводский государственный университет

*На правах рукописи*

**Блажевич  
Любовь Евгеньевна**

**РОЛЬ ТУЧНЫХ КЛЕТОК И НЕЙРОНОВ ИНТРАМУРАЛЬНЫХ ГАНГЛИЕВ  
В СОКРАЩЕНИИ ГЛАДКОЙ МУСКУЛАТУРЫ ТРАХЕИ И БРОНХОВ КРЫСЫ**

Специальность 03.03.01 – Физиология

Диссертация  
на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

**Научный руководитель:**

**Кирилина Валентина Михайловна,**  
кандидат биологических наук, доцент

Петрозаводск – 2016

## Оглавление

<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	стр. 4
<b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	стр. 8
1.1. Физиологическая и экологическая роль нейро-тучноклеточного взаимодействия в системе нижних дыхательных путей .....	стр.8
1.2. Структурно-функциональная организация нижних дыхательных путей ...	стр.10
1.2.1. Структура нижних дыхательных путей .....	стр. 10
1.2.2. Строение гладкомышечной стенки трахеи и бронхов .....	стр. 11
1.3. Иннервация нижних дыхательных путей .....	стр. 12
1.3.1. Нейроны ганглиев и системы нервных волокон трахеи и бронхов.....	стр. 12
1.3.2. Функциональный модуль дыхательных путей .....	стр. 14
1.3.3. Рецепторы трахеи и бронхов .....	стр. 16
1.3.4. Медиаторные системы, управляющие гладкой мышцей дыхательных путей .....	стр. 17
1.4. Тучные клетки в системе нижних дыхательных путей .....	стр. 21
1.4.1. Рецепторы тучных клеток .....	стр. 21
1.4.2. Механизмы дегрануляции тучных клеток .....	стр. 26
1.4.3. Биологически активные вещества гранул тучных клеток .....	стр. 28
1.4.4. Взаимодействия тучных клеток и гладкой мышцы .....	стр. 40
1.5. Нейро-иммунные отношения в нижних дыхательных путях .....	стр. 41
1.5.1. Влияние тучных клеток на нейроны .....	стр. 42
1.5.2. Влияние нейронов на тучные клетки .....	стр. 46
<b>ГЛАВА 2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ</b> .....	стр. 48
2.1. Методика приготовления изолированных препаратов трахеи и бронхов .....	стр. 48
2.2. Методика регистрации сократительной активности препарата .....	стр. 49
2.3. Методика статистической обработки результатов .....	стр. 51
2.4. Дизайн исследования .....	стр. 51
2.5. Фармакологические препараты, используемые в исследовании .....	стр. 52
<b>ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ</b> .....	стр. 53
3.1. Влияние стимуляции нервов и мышцы, аденозина и капсаицина на препараты гладкой мышцы трахеи и бронхов .....	стр. 54
3.1.1. Активность гладкой мышцы трахеи и бронхов, вызванная стимуляцией нервов и мышцы .....	стр. 54
3.1.2. Активность гладкой мышцы трахеи и бронхов при действии аденозина .....	стр. 58
3.1.3. Активность гладкой мышцы трахеи и бронхов при активации С-волокон капсаицином .....	стр. 61

3.1.4. Активность гладкой мышцы трахеи и бронхов при влиянии аденозина на фоне блокады С-волокон капсаицином .....	стр. 64
3.1.5. Активность гладкой мышцы трахеи и бронхов при действии аденозина на фоне блокаде С-волокон и тучных клеток .....	стр. 66
3.2. Роль блокады эпителия в реакции гладкой мышцы .....	стр. 68
3.2.1. Активность гладкой мышцы трахеи и бронхов, вызванная стимуляцией постганглионарных нервов, при ингибировании синтеза простагландинов ....	стр. 69
3.2.2. Активность гладкой мышцы трахеи и бронхов при действии аденозина и ингибировании синтеза простагландинов .....	стр. 70
3.2.3. Активность гладкой мышцы трахеи и бронхов при активации С-волокон и ингибировании синтеза простагландинов .....	стр. 72
3.3. Роль блокады гистаминовых рецепторов в реакции гладкой мышцы .....	стр. 74
3.3.1. Активность гладкой мышцы трахеи и бронхов при стимуляции нервов и блокаде гистаминовых рецепторов .....	стр. 74
3.3.2. Активность гладкой мышцы трахеи и бронхов при действии аденозина и блокаде гистаминовых рецепторов .....	стр. 77
3.3.3. Активность гладкой мышцы трахеи и бронхов при активации С-волокон и блокаде гистаминовых рецепторов .....	стр. 81
3.4. Роль блокады С-волокон, тучных клеток и нервно-мышечной передачи в реакции гладкой мышцы .....	стр.85
3.4.1. Активность гладкой мышцы трахеи и бронхов при блокаде С-волокон...	стр. 85
3.4.2. Активность гладкой мышцы трахеи и бронхов при стабилизации мембран тучных клеток .....	стр. 89
3.4.3. Активность гладкой мышцы трахеи и бронхов при блокаде нервно-мышечной передачи .....	стр. 91
3.4.4. Активность гладкой мышцы трахеи и бронхов при совместной блокаде тучных клеток и нервно-мышечной передачи .....	стр. 97
<b>ГЛАВА 4. ОБСУЖДНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ ....</b>	<b>стр.100</b>
4.1. Влияние аденозина и капсаицина на препараты гладкой мышцы трахеи и бронхов .....	стр. 100
4.2. Роль блокады эпителия в реакции гладкой мышцы .....	стр. 102
4.3. Роль блокады гистаминовых рецепторов в реакции гладкой мышцы .....	стр. 104
4.4. Роль блокады С-волокон, тучных клеток и нервно-мышечной передачи в реакции гладкой мышцы .....	стр. 108
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>	<b>стр. 111</b>
<b>ВЫВОДЫ .....</b>	<b>стр. 112</b>
<b>ИСПОЛЬЗУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА .....</b>	<b>стр. 114</b>

## ВВЕДЕНИЕ

В условиях современной экологической обстановки все больший процент человеческой популяции подвержен влиянию негативных факторов среды, способных привести к нарушению функции дыхания и развитию патологий респираторного тракта. Такие заболевания респираторной системы как бронхиальная астма и хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) во многом связаны с воздействием негативных факторов среды на респираторный тракт и последующим развитием повышенной чувствительности афферентных нервных окончаний или развитием сенсibilизации организма. Явление сенсibilизации – повышенная выработка IgE в ответ на воздействие множества антигенов (аллергенов) окружающей среды, а так же повышенной экспрессии на мембранах тучных клеток Fc-эпсилон-RI - высокоаффинного рецептора к Fc фрагменту молекулы IgE. Сенсibilизированный организм при воздействии на него определенного антигена запускает реакцию дегрануляции тучных клеток, сопровождающуюся выбросом медиаторов быстрой и медленной фазы реакции, оказывающих мультинаправленное действие на ткани, окружающие тучные клетки. Тучные клетки, локализованные в тканях респираторного тракта, при их дегрануляции оказывают влияние на все структуры респираторно тракта. Важнейшим медиатором быстрой фазы дегрануляции является гистамин, оказывающий влияние на локализованные здесь нервные структуры (афферентные нервы – С-волокна и стреч-рецепторы, эфферентные нервы, гистаминовые рецепторы), эпителий, гладкую мышцу и сами тучные клетки. Однако, механизмы воздействия эндогенного тучно-клеточного гистамина на сегодняшний день являются малоизученными. Так же недостаточно сведений о взаимном влиянии тучных клеток и нейронов интрамурального ганглия. Кроме того, большинство исследований по данной теме выполнены на препаратах без применения электрической стимуляции,

что нарушает естественную систему живого организма. Преимуществом данного исследования является применение электрической стимуляции постганглионарных нервов, что приближает исследуемую систему к естественным условиям и позволяет более точно раскрыть нейро-иммунные влияния на гладкую мускулатуру трахеи и бронхов.

**Цель исследования:**

Изучение роли тучных клеток и нейронов интрамуральных ганглиев в сокращении гладкой мускулатуры трахеи и бронхов крысы при активации нейро-иммунных структур аденозином и капсаицином в условиях электрической стимуляции.

**Задачи:**

1. Исследовать влияние аденозина и капсаицина на сократительную активность гладкой мышцы трахеи и бронхов крысы в условиях электрической стимуляции
2. Исследовать роль эпителиальных простагландинов в реакции гладкой мышцы при действии аденозина и капсаицина в условиях электрической стимуляции.
3. Выявить значение гистаминовых рецепторов в сокращении гладкой мышцы при действии аденозина и капсаицина в условиях электрической стимуляции.
4. Исследовать сокращения гладкой мышцы дыхательных путей крысы при блокаде С-волокон, ганглиев и тучных клеток в условиях электрической стимуляции.

**Объект исследования:**

Объектом исследования являлись 72 крысы линии Вистар обоего пола с массой тела 250-500 г. в возрасте двух – трех месяцев.

**Предмет исследования:**

Исследовали влияния тучных клеток и нейронов интрамуральных ганглиев на сократительную активность гладкой мышцы различных отделов дыхательных путей крысы

**Методы исследования:**

Исследование проводилось на изолированных препаратах трахеи и бронхов крысы с применением электрической стимуляции нервов и мышцы.

**Научная новизна:**

Впервые проведено комплексное исследование, моделирующее умеренное влияние внешнего фактора, активирующего иммунную систему (представленную тучными клетками) и нервную систему (представленную С-волоконками), на сократительную активность гладкой мышцы респираторного тракта, вызванную эндогенным выделением медиатора ацетилхолина из постганглионарных нервов. В качестве аналога внешнего фактора в экспериментах использовался аденозин.

Показано, что аденозин в низких концентрациях влияет на активность гладкой мышцы трахеи и бронхов, вызванную эндогенным ацетилхолином, главным образом, опосредованно через активацию тучных клеток с выделением гистамина и С-волокон с выделением тахикининов, а также рефлекторным путем через нейроны интрамурального ганглия. В низких концентрациях действие аденозина непосредственно на гладкую мышцу практически отсутствует.

Показано, что капсаицин, активируя С-волокна, действует на гладкую мышцу непосредственно, выделяя тахикинины, рефлекторно через нейроны интрамуральных ганглиев и опосредованно через активацию тучных клеток с выделением гистамина.

Показано, что эпителий усиливает действие низких доз аденозина на ответы трахеи и бронхов, вызванные эндогенным медиатором, и не влияет на фазу снижения ответов. Эпителий не влияет на эффект С-волокон,

активированных низкими дозами капсаицина, на эндогенно вызванные сокращения гладкой мышцы трахеи и бронхов.

### **Теоретическое и практическое значение работы**

Результаты позволяют раскрыть механизмы участия тучных клеток и метасимпатических нервных структур в управлении гладкомышечной стеной трахеи и бронхов, способствуют пониманию нейро-иммунных взаимодействий в нижних дыхательных путях.

Результаты исследований используются в циклах лекций «Нормальная физиология» в Петрозаводском государственном университете, и могут быть использованы в других университетах биологического и медицинского профиля, а также при разработке новых лекарственных препаратов.

### **Апробация работы**

Материалы диссертации докладывались на 11 Международной конференции «Актуальные проблемы современной науки», г. Томск, 2013 г.; IV Всероссийской Интернет-конференции с международным участием «Современные проблемы анатомии, гистологии и эмбриологии животных», г. Казань, 2013 г.; IV Международной научно-практической конференции «Современные концепции научных исследований», г. Москва, 2014 г., III международной научно-практической конференции «Science in the modern information society», North Charleston, USA. По теме диссертации опубликовано 10 работ.

### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Медиаторы тучных клеток, экзоцитируемые при их частичной дегрануляции, оказывают влияние на сокращения гладкой мускулатуры трахеи и бронхов крысы непосредственно и через нейроны интрамурального ганглия.
2. Нейроны интрамурального ганглия оказывают влияния на ГМ через парасимпатическую и НАНХ систему, а также через активацию тучных клеток.
3. Сокращение гладкой мышцы трахеи и бронхов крыс обусловлено взаимным влиянием тучных клеток и нейронов интрамуральных ганглиев.

## ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Дыхательная система — совокупность органов, обеспечивающих движение воздуха из атмосферы к легочным альвеолам и обратно, и газообмен между поступающим в легкие кислородом и кровью и удалением углекислого газа из организма. Дыхательная система соприкасается с внешней средой и прямо подвержена воздействию различных биотических и абиотических экологических факторов.

### **1.1. Физиологическая и экологическая роль нейротучноклеточного взаимодействия в системе нижних дыхательных путей**

Изменение экологической ситуации может оказывать влияние на нейро-иммунные отношения в системе нижних дыхательных путей. Нейронально-тучноклеточное взаимодействие, наблюдаемое в условиях физиологической нормы, лежит в основе адекватного функционирования нижних дыхательных путей. При нарушении сбалансированного взаимодействия между тучными клетками и нервными структурами, происходит патологическое развитие функционирования нижних дыхательных путей, проявляющееся в развитии единичных бронхоспазмов или постоянного обструктивного заболевания (пароксизмальный кашель, хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), бронхиальная астма). Нарушение нейро-иммунного баланса может быть следствием повышения тонуса парасимпатической нервной системы или активации тучных клеток. Оба нарушения могут стать причинами бронхиальной обструкции.

Влияние внешних экологических факторов на тучные клетки, базофилы и другие иммунокомпетентные клетки связано с их сенсебилизацией или IgE-независимой активацией. Аллергены (выделения



пылевых клещей, соединения продуктов химической промышленности и др.), токсические вещества (оксиды углерода, серы, азота, табачный дым), изменения температуры и влажности воздуха, бактериальные и вирусные респираторные инфекции окружающей среды оказывают влияние на тучные клетки и клетки железистого эпителия, что приводит к развитию эпителиальной деструкции и активации тучных клеток. Активация тучных клеток сопряжена с процессом дегрануляции – высвобождения содержимого гранул тучных клеток во внеклеточные пространства.

В последние годы внимание все большего числа клиницистов-пульмонологов и патофизиологов привлекает гиперреактивность бронхов, которая является ведущим патофизиологическим механизмом развития бронхиальной астмы: степень гиперреактивности бронхов коррелирует с тяжестью заболевания. Явление связано с повышением чувствительности С-волокон неадренэргической нехолинэргической системы (НАНХ системы) (Sears, 1991).

При активации тучных клеток, выделяемые ими медиаторы быстрой фазы аллергической реакции, оказывают возбуждающее влияние на находящиеся здесь нервные структуры (С-волокна), гистаминовые рецепторы, гладкую мышцу, стреч-рецепторы с развитием констрикторного мышечного ответа. Констрикция дыхательного тракта происходит и при активации поллютантами непосредственно чувствительного звена НАНХ системы – С-волокон. Таким образом, нейро-тучноклеточное взаимодействие очень чувствительно к неблагоприятным экологическим факторам, под воздействием которых нормальное физиологическое равновесие между тучными клетками и интрамуральными нервными структурами может нарушаться. Нарушение этого физиологического баланса может привести к развитию обструктивных заболеваний нижних дыхательных путей.

Можно заключить, что непосредственное, ежедневное соприкосновение с человеком аллергенов, содержащиеся в продуктах питания, косметических средствах, одежде, фармакологических препаратах, средствах бытовой

химии, а так же аллергены производственной среды способствует его сенсебилизации. Постоянные стрессы и психологический дискомфорт так же усугубляют эпидемиологическую обстановку. С учетом темпов развития промышленности, накопления в атмосфере поллютантов, увеличения качественного и количественного состава химических сенсibiliзирующих соединений гидросфере и педосфере, увеличения их массовой доли в составе биомассы, эпидемическая ситуация в отношении аллергической обструктивной патологии будет ухудшаться в дальнейшем.

## **1.2. Структурно-функциональная организация нижних дыхательных путей**

Собственно органами дыхания являются легкие, а также верхние и нижние дыхательные пути. Переход верхних дыхательных путей в нижние осуществляется в месте пересечения пищеварительной и дыхательной систем в верхней части гортани. Система верхних дыхательных путей состоит из полости носа и глотки. Система нижних дыхательных путей состоит из гортани (иногда её относят к верхним дыхательным путям), трахеи, бронхов, бронхиол и альвеол.

### **1.2.1. Структура нижних дыхательных путей**

По классификации Вейбеля трахею рассматривают как бронхи нулевого поколения. Она представляет собой полую цилиндрическую трубку. Остов трахеи составляет волокнисто-хрящевая оболочка, которая состоит из 16-20 гиалиновых плоских полуколец, соединяющихся между собой плотной волокнистой соединительной тканью. Дорсальная часть этой оболочки представлена соединительной тканью и гладкой мускулатурой, соединяющей концы хрящевых полуколец.

В месте бифуркации трахея разделяется на два бронха, направляющихся к воротам соответствующего легкого. Бронхи, дихотомически разветвляясь, образуют бронхиальное дерево. До третьего деления они называются главными или крупными, дальше, уменьшаясь в диаметре, переходят в мелкие.

Проводящий отдел респираторного тракта образован четырьмя оболочками. Наружная оболочка (адвентициальная) трахеи представлена фиброзной волокнистой тканью, которая в бронхах и бронхиолах переходит в жировую. Волокнисто-хрящевой слой в трахее и главных бронхах образован гиалиновыми полукольцами, в долевых и сегментарных бронхах – редко расположенными хрящевыми фрагментами, в основном в местах деления бронхов. На уровне субсегментарных бронхов гиалиновый хрящ замещается эластическим. У мелких животных хрящевые пластинки отсутствуют уже на уровне долевых бронхов. Внутридолевые бронхи хрящевой не имеют. В подслизистом слое имеются железы, вырабатывающие серозный, слизистый и смешанный секрет. Собственная пластинка слизистой оболочки снаружи имеет эпителий, покрытый слоем слизи, а в терминальных бронхиолах - поверхностно активным веществом и слизью.

### **1.2.2. Строение гладкомышечной стенки трахеи и бронхов**

Задняя стенка трахеи и стенка бронхов представлена в основном гладкомышечной тканью (Stephens et al., 1975). Мышечные клетки имеют эллиптическую форму со средним диаметром  $3,3 \pm 0,5$  мкм при длине около 1,0 мм. Клетки бедны саркоплазматическим ретикулумом, плазматическая мембрана имеет большое количество впячиваний. Мышечные клетки отделены друг от друга коллагеновыми волокнами. Базальная мембрана, не прерываясь, на концах одной клетки переходит в другую, что ведет к образованию микросаркомеров. Между миоцитами имеются контакты – нексусы, через которые проходит электрическое возбуждение. Число

контактов в бронхах значительно меньше, чем в трахее. С уменьшением калибра бронхов процентное соотношение мышечного слоя увеличивается.

### **1.3. Иннервация нижних дыхательных путей**

Иннервация нижних дыхательных путей представлена симпатическими, парасимпатическими и метасимпатическими (внутриорганными) нервными структурами. Основная роль в регуляции тонуса и сокращений гладкой мускулатуры трахеи и бронхов отводится волокнам и нейронам блуждающего нерва и метасимпатических ганглиев. Дополнительное влияние оказывает неадренэргическая нехолинэргическая (НАНХ)-система. Влияние симпатической нервной системы в дыхательных путях многих животных менее выражено, а у человека иннервация гладкомышечной ткани дыхательных путей симпатическими нервами отсутствует.

#### **1.3.1. Нейроны ганглиев и системы нервных волокон трахеи и бронхов**

В иннервации трахеи и бронхов участвуют следующие нервные структуры: 1) холинэргические парасимпатические нервы, медиатором которых является ацетилхолин; 2) адренэргические симпатические нервы с медиатором норадреналином; 3) неадренэргические тормозные нервы интрамуральных ганглиев, медиаторами в которых являются вазоактивный интестинальный пептид (ВИП) и оксид азота (NO); 4) нехолинэргические возбуждающие нервы, медиаторами в которых выступают субстанция Р и нейрокинины. Баланс в работе этих систем обеспечивает нормальное проведение воздушного потока и вентиляцию легких. Интрамуральная нервная система в трахее и бронхах обладает большой самостоятельностью и функционирует даже при изоляции респираторного тракта, поэтому симпатические и парасимпатические нервы можно рассматривать как пути,

осуществляющие связь внутриорганной нервной системы с центральной нервной системой.

У человека и большинства млекопитающих в иннервации дыхательных путей ведущее место занимает блуждающий нерв (n.vagus), содержащий чувствительные, автономные и соматические нервные волокна (Coulson et al., 2003). Стимулирование холинергических парасимпатических нервов вызывает выделение ацетилхолина (АХ), который через взаимодействие с мускариновыми рецепторами (МР) гладких мышц, легочных сосудов и желез дыхательных путей обеспечивает тонус и сокращение бронхов, секрецию слизи и вазодилатацию (Coulson et al., 2003; Belmonte 2005). Нарушение вагусной регуляции может приводить к увеличению холинергического тонуса гладких мышц, секреции слизи, кашля и нарушению дыхания (Undem, 2005).

Симпатические волокна нижние воздухоносные пути получают от шейных симпатических ганглиев и первых четырех ганглиев пограничного симпатического ствола. Симпатические волокна соединяются с блуждающим нервом и вместе с ним попадают в нижние дыхательные пути. Стимуляция симпатического нерва вызывает дилатацию гладкой мускулатуры бронхов.

Симпатические и парасимпатические нервы, подходя к респираторному тракту, образуют нервные сплетения, представляющие собой систему ганглиев и соединяющих их нервов. В трахее ганглии располагаются, в основном, в адвентиции дорсальной стенки, в бронхах – в местах разделения бронхов, после отхождения бронхов третьего порядка число ганглиев резко уменьшается и, возможно, они отсутствуют в бронхиолах (Федин и др., 1997).

На нейронах интрамуральных ганглиев оканчиваются нервные волокна, идущие из центральной нервной системы по парасимпатическим и симпатическим путям, от соседних ганглиев сплетения по межганглионарным коннективам, а также от рецепторов, находящихся в стенке дыхательных путей.

Распределение ганглиев меняется в различных частях воздухоносных путей. Так, в трахее крысы их количество увеличивается в каудальном направлении, большинство нервных узлов располагаются вдоль правой границы мышечной стенки, образуя с соединяющими их волокнами своеобразный тяж (Ноздрачев и др., 1985). В бронхиальных сплетениях скопления ганглиев наблюдались в местах бифуркации бронхов. Позади точки отхождения бронхов третьего порядка ганглии обнаруживаются реже. Ганглии нижних дыхательных путей отличаются по форме и размерам и содержат от единиц до нескольких десятков нейронов. Все они окружены соединительнотканной оболочкой.

### **1.3.2. Функциональный модуль дыхательных путей**

Ганглионарные нейроны объединены в функциональные модули, включающие в себя четыре основные группы клеток (Федин, 2001): эффекторные возбуждающие и тормозные нейроны, сенсорные нейроны и клетки, формирующие ритмическую активность (генератор ритма) (рис. 1.1). В состав каждой из этих групп может входить разное число клеток.

Активность эффекторной возбуждающей группы клеток поддерживается импульсным потоком, поступающим по парасимпатическим волокнам от ядер блуждающего нерва и от ганглионарных тонических нейронов НЗ. Формирование ритмической активности осуществляется несколькими клетками. Генератор ритма возбуждает тормозную группу эффекторных нейронов и одновременно тормозит через промежуточный ритмически разряжающийся нейрон возбуждающую группу. На нейронах генератора ритма оканчиваются парасимпатические волокна, волокна от рецепторов, залегающих в стенке дыхательных путей, и нервные волокна от соседних ганглиев (Федин, 2001).

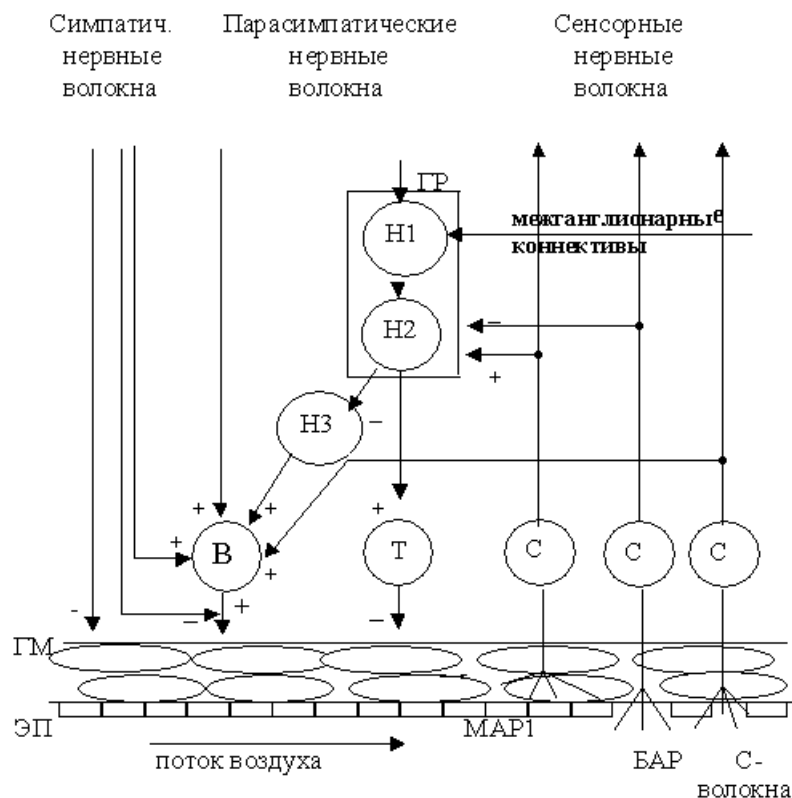


Рис. 1.1. Схема функционального модуля (Федин, 2001).

ГР - генератор ритма, Н1 и Н2 - нейроны генератора ритма, Н3 - интернейрон, В и Т - эффекторные возбуждающий и тормозный нейроны, С - сенсорные клетки, МАР и БАР - медленно и быстро адаптирующиеся рецепторы, ГМ - гладкомышечные клетки, Эп - эпителий.

+ - возбуждающие синапсы, - тормозные синапсы.

Совокупность функциональных модулей, объединенных возбуждающими и тормозными связями, образует периферический нервный центр, управляющий работой нижних дыхательных путей. Ганглии дыхательных путей обеспечивают интегративный нервный вход, управляющий тонусом гладкой мышцы, секрецией желез, местным капиллярным кровотоком, иммунными образованиями, и опосредуют трахеобронхиальные рефлексy (Федин, 2001; Zhu, 2001).

Медиаторы и рецепторы нейронов. На соме и дендритах нейронов находятся никотиновые рецепторы, через которые осуществляется

межнейронная передача сигналов (Федин, Ноздрачев, 1995), мускариновые M1 рецепторы, модулирующие возбудимость нейронов, нейрокининовые NK1 рецепторы, на которых оканчиваются терминали, выделяющие вещество P (SP) и обеспечивающие сенсорную иннервацию (Deu, 1996). Кроме того, на нейронах находится большое число рецепторов (серотониновые, ГАМК, гистаминовые и другие), выполняющие модулирующую роль. Эффекторные возбуждающие нейроны выделяют из аксонов ацетилхолин (АХ), а тормозные эффекторные – окись азота (NO). Вазоактивный интестинальный пептид (ВИП) колокализован в холинергических эфферентных терминалях (Deu, 1996). Тормозные нейроны могут посылать нервные импульсы к холинергическим нейронам ганглия (Canning, 2006). Эти связи содействуют нервному управлению гладкой мышцей бронхов и сосудов, а также секреции бронхиальных желез (Zhu, 2001).

### 1.3.3. Рецепторы трахеи и бронхов

В нижних воздухоносных путях располагается множество рецепторов, играющих большую роль в оптимизации дыхательного акта. В трахее и бронхах на сегодняшний день выделены 4 типа рецепторов - медленно адаптирующиеся стретч-рецепторы, быстро адаптирующиеся стретч-рецепторы, рецепторы С-волокон (бронхиальные и пульмональные) и сенсорные нейроэпителиальные клетки (НЭК) (Brouns, 2003).

Значительное число *медленно адаптирующихся рецепторов* находится во внегрудной части трахеи. Их активация зависит от скорости и глубины дыхания и приводит к расслаблению гладкомышечной ткани (Undem, 2005).

*Быстро адаптирующиеся рецепторы* встречаются во всех отделах трахеобронхиального дерева. Адекватными стимулами для них являются механические воздействия, а также раздражающие газы и кислота (Matsumoto 1993). Возбуждение быстро адаптирующихся рецепторов



приводит к рефлекторному сокращению гладкой мускулатуры дыхательных путей, они участвуют в кашлевом рефлексе (Undem, 2005).

*Бронхо-легочные С-волокна* составляют большинство афферентных волокон, иннервирующих респираторный тракт, они реагируют, главным образом, на химические раздражители, и являются низкопороговыми медленно адаптирующимися рецепторами. Почти все С-волокна являются капсаицин-чувствительными, им свойственна двойная сенсорно-эффекторная функция: инициация сенсорных нервных импульсов и выделение медиаторов (Reynolds, 1997). В паренхиме легких они обнаружены около капилляров (иногда их называют юктакапиллярными или J-рецепторами). С-волокна отходят от нейронов яремного и узловатого ганглиев. Кроме того, легкие иннервированы С-волокнами, идущими от ганглиев спинных корешков, они подобны С-волокнам яремного ганглия (Undem, 2005).

*Нейроэпителиальные клетки (НЭК)*. В эпителии внутрилегочных дыхательных путей имеются диффузно распространенные группы нейроэндокринных клеток. Они имеют типичные эндокринно-подобные везикулы, которые содержат АТФ, серотонин и нейропептиды (Adriaensen, 2006; Brouns, 2003). НЭК предназначены для регистрации изменений в концентрации газов и реагируют главным образом на гипоксию.

### **1.3.4 Медиаторные системы, управляющие гладкой мышцей дыхательных путей**

Бронхоконстрикция и бронходилатация дыхательных путей опосредуются разными нервными системами. За бронхоконстрикцию ответственны холинергическая и возбуждающая неадренергическая нехолинергическая (вНАНХ) системы, за бронходилатацию – адренергическая и тормозная неадренергическая нехолинергическая (тНАНХ) системы. Одна мышечная клетка может получать импульсы от разных нейронов и в ней могут регистрироваться как возбуждающие так и тормозные потенциалы.

Холинергические механизмы. Ацетилхолин, выделяемый холинергическими нейронами и нервами взаимодействует с мускариновыми и никотиновыми рецепторами. Никотиновые рецепторы расположены на нейронах функционального модуля.

В трахее и бронхах различают три подтипа мускариновых рецепторов (рис. 1.2). В ганглионарных нейронах  $M_1$  рецепторы моделируют никотиновую нейротрансмиссию (Belmonte, 2005). На холинергических постганглионарных терминалях находятся нейрональные тормозные мускариновые  $M_2$  рецепторы, которые действуют как тормозные рецепторы обратной связи (авторецепторы) и ингибируют высвобождение ацетилхолина (Santos, 2003). На гладкой мышце находятся мускариновые  $M_3$  рецепторы, стимуляция которых реализуется в активацию фосфолипазы C, увеличение концентрации внутриклеточного кальция и в сокращение.  $M_2$  рецепторы гладкой мышцы противодействуют бронхолитическому эффекту  $\beta_2$ -агонистов за счет торможения накопления цАМФ и облегчения  $M_3$ -связанного сокращения (Belmonte, 2005).

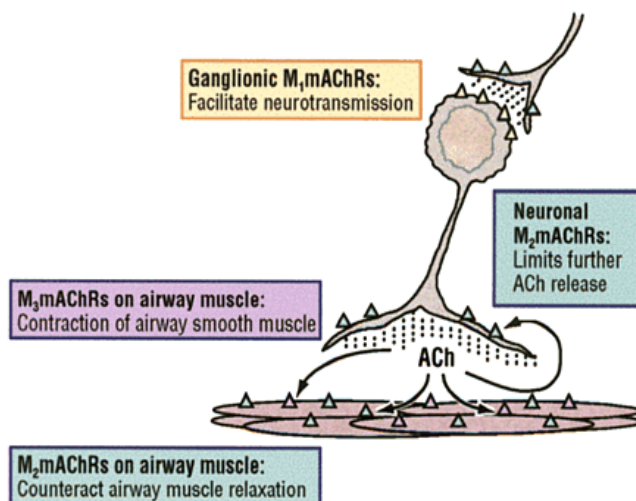


Рис. 1.2. Мускариновые рецепторы на парасимпатических нервах легких и гладкой мышце дыхательных путей (Belmonte, 2005).

ACh – ацетилхолин, mAChRs – мускариновый холинорецептор.

Возбуждающие неадренергические нехолинергические волокна отходят от нейронов сенсорных ганглиев блуждающего нерва (узловатого и яремного) и ганглиев дорсальных корешков (Jacoby, 2003). Это капсаицин-чувствительные С-волокна. Они посылают отростки в эпителий и к нейронам интрамуральных ганглиев дыхательных путей. Тахикинины, выделяемые из С-волокон, вызывают сужение дыхательных путей вследствие прямого действия на гладкую мышцу через НК2 рецепторы и за счет повышения активности ганглионарных нейронов, на мембране которых имеются также рецепторы к SP (НК1 рецепторы). Капсаицин-чувствительные С-волокна образуют сплетения прямо под эпителием, вызывают бронхоконстрикцию в ответ на тепловые раздражители, холод, повреждающее механическое воздействие. Они могут также реагировать на вещества, выделяющиеся в результате повреждения ткани или воспаления (Undem, Kollaric, 2005).

Адренергические тормозные механизмы. Бета2-адренорецепторы находятся на гладкой мышце и эффекторных возбуждающих нейронах функционального модуля, их активация тормозит холинергическую нейротрансмиссию (Yu, 1993). Активация бета2-адренорецептора опосредуется главным образом через цАМФ, что приводит к фосфорилированию регуляторных белков мышцы, открытию кальций-активированных калиевых каналов большой проводимости, модификации концентрации кальция в клетке и релаксации мышцы (Johnson, 2001). Плотность сети флуоресцирующих адренергических волокон в гладкой мышце воздухоносных путей морской свинки прогрессивно уменьшается от гортанного конца трахеи к бронхиолам, где обнаруживаются только единичные волокна. Адренергические волокна в легких направляются главным образом к сосудам. В гладкой мышце респираторного тракта человека флуоресцентная микроскопия не выявила наличия адренергических волокон, имеются данные, что они направляются к нейронам интрамуральных ганглиев и железам.

Тормозные т-НАНХ бронходилататорные механизмы. Основными медиаторами торможения нейронов функционального модуля являются оксид азота (NO) и вазоактивный интестинальный пептид (ВИП). Эти медиаторы модулируют холинергическую нейротрансмиссию на уровне гладкой мышцы или через пресинаптическое торможение выделения ацетилхолина (Belvisi, 1993). Плотность NO-содержащих волокон в гладкой мышце человека уменьшается от трахеи к периферии и полностью отсутствует в бронхиолах. В ганглиях, наоборот, число NO-содержащих нейронов увеличивается с 57% (в трахее) до 83% (в малых бронхах). Кроме того, разные медиаторы производят бронходилатацию через NO, синтезируемый клетками эпителия (Tamaoki, 1994).

ВИП также моделирует холинергическую передачу, уменьшая SP-вызванное освобождение ацетилхолина (Colasurdo, 1995). При хроническом бронхите уровень ВИП снижен, и он негативно коррелирует с выраженностью бронхиальной обструкции. Этот медиатор оказывает тормозное влияние на гладкую мышцу в низких концентрациях пресинаптически, а в высоких – постсинаптически. Отмечена частая колокализация NO и ВИП в нейронах. (Maruno, 1995).

Эпителий и железы подслизистой иннервируются холинергическими нервами, происходящими из ганглиев дыхательных путей (Coulson, 2003). На клетках локализованы мускариновые M1 и M3 рецепторы. Холинергическая нервная стимуляция увеличивает секрецию слизи через мускариновые M3 рецепторы.

Иммунореактивные волокна для субстанции P (SP) и кальцитонин ген-родственного пептида (КГРП) обнаружены внутри и под реснитчатым эпителием, в основной пластинке. В эпителии оканчивается до 85% SP-нервов дыхательных путей (Maruno, 1995).

## **1.4. Тучные клетки в системе нижних дыхательных путей**

Тучные клетки образуют диффузную систему секреторных клеток и активно участвуют в реакциях на патогенные раздражители; они являются важными эффекторными клетками иммунитета. В дыхательных путях они располагаются на поверхности слизистой оболочки, в межклеточных пространствах эпителиальной выстилке, вблизи нервных клеток. Они могут мигрировать через подслизистые ткани в просвет альвеол и бронхов. Трансмисмиттеры тучных клеток оказывают мультинаправленное действие на клетки гладкой мускулатуры, опосредованное различными способами взаимодействия и проявляющееся преимущественно генерализованным спазмом респираторных путей. Сенсibilизация организма, развивающаяся в ответ на соприкосновение с аллергенами окружающей среды, связана с физиологией тучных клеток. Рецепторы тучных клеток, связанные с иммуноглобулином IgE и аллергеном, запускают процесс дегрануляции тучных клеток с выбросом медиаторов аллергической реакции. Кроме качественных характеристик меняются и количественные: в очаге аллергической реакции увеличивается количество тучных клеток. Таким образом, тучные клетки могут быть рассмотрены как наиболее важные компоненты патофизиологии астмы и хронической обструктивной болезни легких.

### **1.4.1. Рецепторы тучных клеток**

Тучная клетка занимает одно из центральных мест в аллергической реакции. Ее изначальная защитная роль заключается в мобилизации иммунной реакции в месте локализации патогена (аллергена). На поверхности тучных клеток содержатся рецепторы к IgE, гистаминовые, холинэргические, адренэргические, аденозиновые рецепторы, рецепторы к простагландинам и др.

### **Рецепторы Fc-эпсилон-RI**

В условиях воздействия аллергенов на организм происходит повышение концентрации IgE - основного иммунологического маркера сенсибилизации. На поверхности тучных клеток и базофилов экспрессирован высокоаффинный рецептор к Fc фрагменту молекулы IgE, так называемый Fc-эпсилон рецептор первого типа или Fc-эпсилон-RI (Vames, 1994). Каждая клетка содержит от 50 до 300 000 рецепторов к IgE. Высокий аффинитет между IgE и тучной клеткой лежит в основе гиперчувствительных реакций (Чучалин, 1997).

IgE фиксируется своим Fc-фрагментом к специфическим рецепторам. Существенная часть общего IgE фиксируется на тучных клетках и базофилах. При IgE-зависимой активации антиген должен соединиться по крайней мере с двумя молекулами IgE на поверхности тучной клетки, поэтому антигены, несущие один участок связывания с антителом, не активируют тучные клетки. Образование комплекса между антигеном и несколькими молекулами IgE на поверхности тучной клетки активирует ферменты, связанные с мембраной, в том числе фосфолипазу C, метилтрансферазы и аденилатциклазу (Адельман, Сэксон, 2000). Для активации рецептора и передачи сигнала несущей его клетке необходима агрегация Fc-эпсилон-RI с антигеном. Она достигается при распознавании фиксированными к рецептору молекулами IgE поливалентного антигена (аллергена). Если поступающий аллерген распознается фиксированными на тучной клетке антителами происходит агрегация IgE и перекрестное реагирование двух или более Fc-эпсилон-RI (Vames, 1994). IgE прочно связываются с рецепторами к Fc-фрагменту на поверхности тучных клеток и находятся здесь до 6 недель (Лолор, Тэшкин, год), сохраняя сенсибилизацию организма. При IgE-зависимой активации антиген должен соединиться по крайней мере с двумя молекулами IgE на поверхности тучной клетки, поэтому антигены, несущие один участок связывания с антителом, не активируют тучные клетки. Механизм внутриклеточной передачи сигнала от Fc-эпсилон-RI быстро, в

течение одной минуты, приводит к активации тучной клетки (базофила) и секреции биологически активных веществ — медиаторов аллергии. Этот феномен благодаря морфологической перестройке клетки получил название дегрануляции тучной клетки или базофила (Bames, 1994).

### **Аденозиновые рецепторы**

В организме нуклеозид аденозин является активным метаболитом биохимических процессов. Аденозин высвобождается в результате постоянного гидролиза АТФ и периодической дегрануляции тучных клеток. В тучных клетках присутствуют аденозиновые рецепторы A<sub>2A</sub> (Suzuki, Takei, 1998), A<sub>2B</sub> (Feoktistov, Biaggioni, 1998) и A<sub>3</sub>, которые, будучи активированными аденозином, облегчают антигенобусловленную дегрануляцию тучных клеток (Baraldi, Cacciari, Merighi et al., 2000).

Аденозиновые рецепторы A<sub>2</sub> и A<sub>3</sub> взаимодействуют с различными G-белками: рецепторы A<sub>3</sub> – с Gi/o-белком, а рецептор A<sub>2</sub> – с Gs-, Gq-белками. Кроме того, имеются данные, что все аденозиновые рецепторы могут взаимодействовать и с другими G-белками (Auchampach, Gross, 2005; Brown, Ollerstam, 1998; De Lima, da Silva, 1998).

*Рецепторы A<sub>2</sub>*: являются стимуляторами аденилатциклазы (Winchilli, Elswick, 2007). Субъединицы G-белка, связанного с рецепторами, A<sub>2A</sub> и A<sub>2B</sub> различаются их высокой и низкой аффинностью к аденозину, соответственно (Feoktistov, Polosa, 1998). Активация рецепторов A<sub>2A</sub> наблюдается в норме (рис. 1.3) и сопряжена с супрессией высвобождения гистамина и триптазы из тучных клеток (Hughes, Holgate, 1984; Peachell, Lichtenstein, 1991). Это представляет собой балансирующий механизм авторегуляции. Низкие концентрации аденозина связываются с высоко аффинными A<sub>2A</sub>-рецепторами и Gs-белками, что приводит к снижению тучно-клеточной дегрануляции. Высокие концентрации гистамина, наблюдаемые при таких заболеваниях как бронхиальная астма и ХОБЛ, активируют низко аффинные A<sub>2B</sub>-рецепторы и Gq-белки, которые вызывают значительную тучно-

клеточную дегрануляцию, приводящую к развитию бронхоспазма (Cronstein, Levin, 1992).

*Рецепторы A3*: являются ингибиторами аденилатциклазы. После активации G-белков активируются определенные ферменты и ионные каналы и запускается каскад сложных биохимических превращений, приводящих к дегрануляции лейкоцитов (Ferre, Popoli, 1994; Winchilli, Elswick, 2007). Однако, A3-рецепторы обнаружены только на мембранах тучных клеток различных видов грызунов, на человеческих тучных клетках респираторного тракта A3 рецепторы отсутствуют (Walker, Jacobson, 1997).

Полагают, что блокада аденозиновых рецепторов угнетает дегрануляцию (Лолор, Тэшкин, год). Использование неселективного антагониста аденозиновых рецепторов теofilлина широко применяется при лечении астмы, хотя механизм его действия на систему GPCR до конца не ясен (Baraldi, Cacciari, Merighi et al., 2000). Гетерогенность аденозин-ассоциированных механизмов прежде всего определяется подтипом рецепторов и их плотностью в составе структуры. Взаимодействие с рецепторами тучных клеток подтипа A<sub>2B</sub> приводит к высвобождению гистамина (рис. 1.4), который ведет к сокращению гладкой мускулатуры, взаимодействие же с рецепторами A<sub>2A</sub> приводит к уменьшению дегрануляции (Anvari, Sharma, Fernandez, 2010). Сформулированы представления об изменении соотношения количества пуриnergических рецепторов разных подтипов. В частности, Varani K. показано увеличение уровней транскриптов для A<sub>2A</sub>R при снижении A<sub>2B</sub>R у больных хронической обструктивной болезнью легких (Varani, Caramori, 2006).



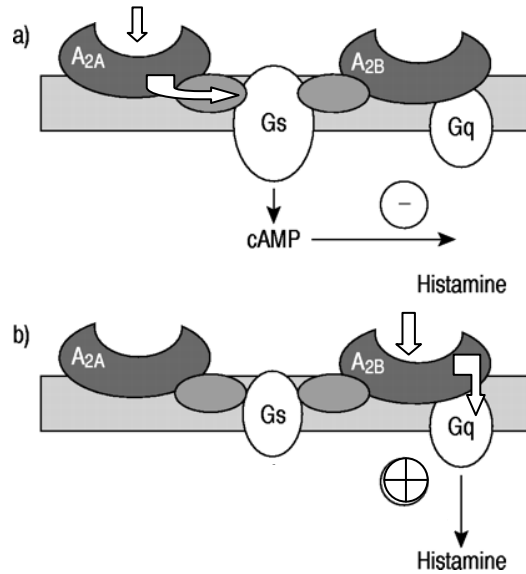


Рис. 1.3 Пути влияния аденозина в норме (а) и в патологии (b) (Polosa, 2002)

- уменьшение синтеза гистамина

+ увеличение

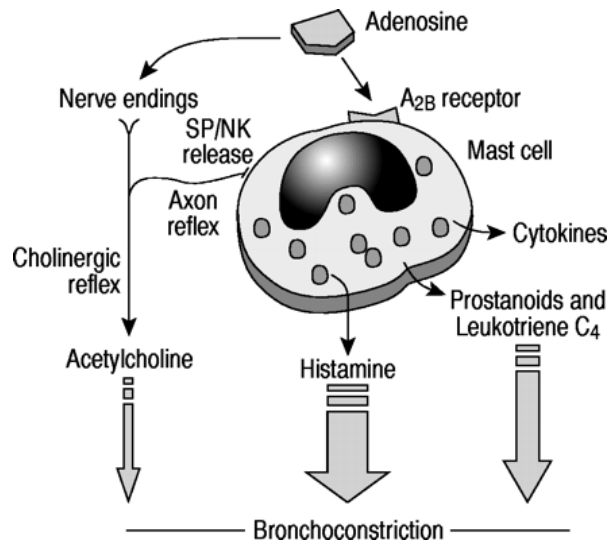


Рис. 1.4 Влияние аденозина на A<sub>2B</sub> рецепторы тучных клеток и на нервы НАНХ-системы (Polosa, 2002)

### Гистаминовые рецепторы

Другие важнейшие рецепторы тучных клеток – гистаминовые рецепторы. H<sub>1</sub>-рецепторы локализованы на мембране тучных клетках. Активация этих рецепторов приводит к увеличению продукции цГМФ и

повышению концентрации внутриклеточного кальция. Гистаминовые H<sub>2</sub> рецепторы, находящиеся на мембране тучной клетки, участвуют в аутокринном механизме регуляции. Постоянная частичная дегрануляция, наблюдаемая в норме, способствует выбросу низких концентраций гистамина, который активирует H<sub>2</sub>-рецепторы и запускает каскад биохимических реакций, блокирующих дальнейшую дегрануляцию. Таким образом, нарушение работы H<sub>2</sub>-рецепторов тучных клеток нижних дыхательных путей может являться причиной развития бронхоспазма.

### **Другие рецепторы**

Мембраны тучных клеток содержат рецепторы к ацетилхолину, адреналину, простагландинам, тахикининам и другим биологически активным соединениям. Выброс медиаторов тучными клетками под действием M-холиностимуляторов и простагландина F<sub>2</sub>альфа опосредован повышением уровня цГМФ. Стимуляция альфа-адренорецепторов приводит к снижению уровня цАМФ, что также вызывает дегрануляцию тучных клеток. Стимуляция бета-адренорецепторов приводит к повышению уровня цАМФ и, как следствие, к угнетению дегрануляции тучных клеток.

### **1.4.2. Механизмы дегрануляции тучных клеток**

IgE-зависимая дегрануляция тучных клеток при специфической реакции антиген — антитело наступает в течение ближайшей минуты (Чучалин, 1997). Взаимодействие антигена с IgE на поверхности клеток приводит к активации мембранных ферментов (Рис. 1.5, Рис. 1.6) (Barnes, 1992). В результате происходит перераспределение жирных кислот фосфолипидов в клеточной мембране и, вследствие этого, локальное изменение ее структуры, что, в свою очередь, способствует формированию "кальциевых ворот" и поступлению ионов кальция в клетку через кальциевые каналы (Barnes, 1992; Чучалин, 1997). Ионы кальция играют важную роль в повышении уровня цАМФ, который оказывает альтерирующее воздействие

на мембраны гранул. Так формируются внутриклеточные механизмы, которые в итоге приводят к дегрануляции тучных клеток (Чучалин, 1997).

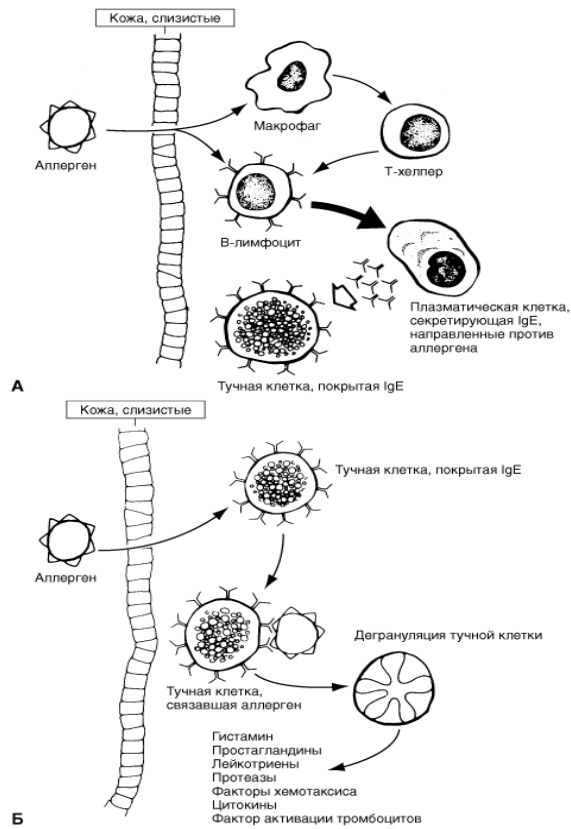


Рис. 1.5 Дегрануляция тучных клеток (Лолор, Фишер, Адельман, 2000). А – сенсбилазация организма; Б дегрануляция тучных клеток

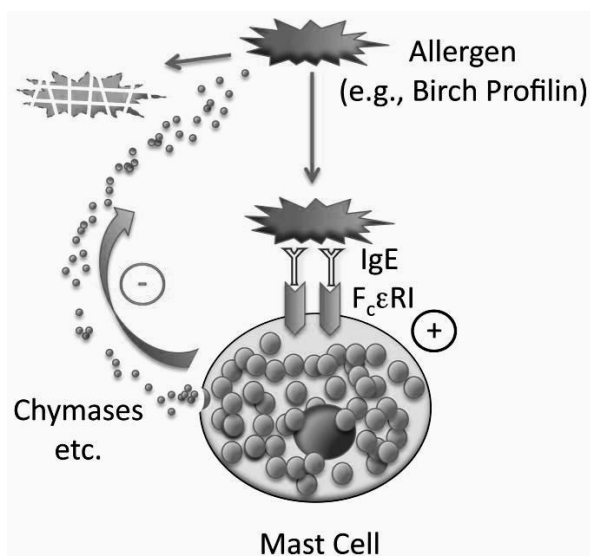


Рис. 1.6 IgE-независимая активация тучных клеток с последующей дегрануляцией (Bradding, Walls, 2006)

Дегрануляция тучных клеток занимает центральное место в развитии патохимических изменений при бронхиальной астме. Она может совершаться вследствие реакции антиген — антитело, но может происходить и под воздействием неспецифических факторов. Активаторы тучных клеток подразделяются на IgE-зависимые (антигены) и IgE-независимые. К IgE-независимым активаторам тучных клеток относятся миорелаксанты, опиоиды, рентгеноконтрастные средства, анафилатоксины (C3a, C4a, C5a), нейропептиды (например, субстанция P), АТФ, интерлейкины-1, интерлейкины-3. Тучные клетки могут активироваться и под действием физических факторов: холода, механического раздражения, солнечного света, тепла и физической нагрузки.

В зависимости от стимулятора реакция тучных клеток может быть одно- или двухфазной. Так, при стимуляции тучных клеток, опосредованной рецепторами к IgE, наблюдаются ранняя и поздняя реакции, а при стимуляции опиоидами и холодом - только ранняя.

### **1.4.3. Биологически активные вещества гранул тучных клеток**

Характерными особенностями лаброцитов являются способности вырабатывать, депонировать и секретировать биологически активные вещества и медиаторы, что отражается в наличие в цитоплазме обильной метахроматической зернистости (Пащенко, Гамалея, 2000).

Медиаторы высвобождаются из гранул не все сразу. Выявлена определенная фазность выделения даже одного медиатора. (Чучалин, 1997). Большинство медиаторов, формируются в гранулах тучных клеток: гистамин, серотонин, сериновые протеазы (триптаза, химаза), гепарин, катепсин G, пероксидазы, многие кислые протеазы, карбоксипептидазы, антимикробные пептиды (н-р, кателицидин).

Провоспалительные липидные медиаторы синтезирующиеся и высвобождающиеся тучными клетками включают следующие соединения: простагландины ( $\text{PGE}_2$  и  $\text{PGD}_2$ ), цистеиновые лейкотриены ( $\text{LTB}_4$ ,  $\text{LTC}_4$ ) и тромбоцитарный активирующий фактор. Так же тучные клетки высвобождают и синтезируют цитокины и хемокины, вовлеченные в процессы воспаления, иммунитета, гемапоэза, тканевого ремоделирования и др. Человеческие и мышинные тучные клетки синтезируют фактор некроза опухоли ( $\text{TNF-}\alpha$ , tumor necrosis factor), трансформирующий ростовой фактор ( $\text{TGF-}\beta$  transforming growth factor), фактор роста фибробластов ( $\text{FGF-2}$ , fibroblast growth factor), сосудистый эндотелиальный фактор роста ( $\text{VEGF}$ , vascular endothelial growth factor), гранулярный макрофагический колониестимулирующий фактор ( $\text{GM-CSF}$ , granulocyte macrophage colony stimulating factor), фактор роста нервов ( $\text{NGF}$ , от англ. nerve growth factor), тромбоцитарный фактор роста (platelet-derived growth factor), интерферон-,  $\text{ИФН-}\beta$ ,  $\text{ИФН-}\gamma$ , интерлейкины и некоторые С-С и СХС-хемокины, включая моноцитарный хемотаксический протеин ( $\text{MCP-1}$ ) $\text{CCL2}$ ), от англ. monocyte chemotactic protein) и макрофагический воспалительный протеин -  $1\alpha$ ( $\text{CCL3}$ ) (Caughey, George H., 1989).

**Триптаза.** Триптаза является наиболее специфическим маркером тучноклеточной активности. Существуют значительная видовая вариация ее активности у различных видов животных. Тучные клетки многих позвоночных, включая карпа, лягушку, курицу, кролика, морскую свинку и мышь не проявляли триптазной активности. Тучные клетки крыс имеют низкую величину активности; в то время как у собаки, обезьяны и человека эта активность максимально выражена.

Триптаза может являться причиной гиперреактивности. Она увеличивает чувствительность бронхов к гистамину. В отсутствие гистамина триптаза не оказывает эффекта на тонус гладкой мускулатуры. Триптаза потенцирует также действие агонистов, таких как серотонин,  $\text{KCl}$ , которые подобно гистамину являются причиной мышечного сокращения, по

средством вовлечения вольтаж-зависимых  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов. Но действие триптазы не увеличивается по отношению к ацетилхолину, который сокращает гладкую мускулатуру без затрагивания мембранного потенциал-зависимого кальциевого транспорта. Т.о., триптаза может оказывать действие на вольтажзависимые  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы, предположительно, посредством гидролиза  $\text{Ca}^{2+}$ -канальных белков или белков, регулирующих кальциевые каналы. Возможно, что триптаза высвобождается вместе с гистамином из гранул тучных клеток в процессе дегрануляции, повышая таким образом бронхоконстрикцию в ответ на гистамин и другие агонисты.

Триптаза деградирует и инактивирует вазоактивный интестинальный пептид, но не гидролизует бронхоконстриктивную нейропептидную субстанцию Р в респираторных сенсорных нейронах, несмотря на присутствие потенциального триптичного сайта для расщепления, тем самым способствует бронхиальной гиперреактивности при астме. Тучноклеточные ферменты не прекращают трахеальную релаксацию, вызванную непептидными агонистами, например изопротеренолом.

**Химаза.** Химаза – тучноклеточная специфическая сериновая протеаза с хемотрипсин-подобной специфичностью. Только 10 % тучных клеток легких содержат иммунореактивную химазу. В отличие от человеческих тучных клеток, в которых преобладает триптаза, крысиные лаброциты содержат химазу как основную нейтральную протеазу.

Существует два различных типа химазы у крыс: тучноклеточная протеаза RMCPI (rat mast cell protease-I) – локализованная в соединительнотканых тучных клетках и тучноклеточная протеаза RMCPII – локализованная в тучных клетках слизистого слоя. Эти две протеазы структурно и функционально различны. RMCPI – более активна каталитически, чем RMCPII.

Химаза расщепляет VIP-пептид и субстанцию Р. В коже химаза ослабляет или прекращает полностью аксон-рефлекс-опосредованное нейрогенное воспаление (Kobayashi, Kume, 2007). De Lima WT и da Silva ZL

показали, что тучноклеточная химаза прекращает респираторную гладкомышечную релаксацию, вызванную вазоактивным интестинальным пептидом у хорьков. Химаза менее интенсивно прекращает эффект, вызванный VIP. Химаза не прекращает релаксацию трахеи, вызванную непептидными адренэргическими агонистами, например, изопротернололом (De Lima, da Silva, 1988).

**Гистамин.** Основным медиатором тучных клеток является гистамин. Гистамин депонируется в гранулах лаброцитов и базофилов в комплексе с гепарином, фактором активации тромбоцитов (ФАТ) и другими соединениями. Освобождение гистамина из клеток может возникать в результате физиологического экзоцитоза или при повреждении и распаде клеток (Пашенков, Гамалея, 2000). Тучные клетки одно из самых мощных депо гистамина в организме.

Физиологическая активность гистамина в дыхательных путях проявляется прежде всего в увеличении тонуса бронхов и снижении бронхиальной проходимости, которая усугубляется отеком слизистой бронхов в силу расширения ее венул с повышением проницаемости эндотелия сосудов и усилением трансудации белков плазмы и миграции клеток из сосудов в ткани стенки бронхов. Пик действия гистамина наблюдается через 1—2 мин после его высвобождения, продолжительность действия — до 10 мин. Гистамин инактивируется в результате дезаминирования гистаминазой и метилирования N-метилтрансферазой.

Действие гистамина в дыхательных путях опосредовано H1-, H2- и H3-рецепторами. Недавно открыт гистаминовый H4-рецептор (H4), который локализован в макрофагах и модулирует аллергические реакции через влияние на активацию T-клеток (Dunford et al., 2006). Гистаминергические рецепторы обнаружены на мембранах практически всех видов клеток.

В дыхательных путях преобладают H1-рецепторы, Они располагаются на мышечных клетках (Thompson et al., 1982), на ганглионарных нейронах (Ischinose et al., 1989; Myers, Bradly, 1995), на эпителиальных и тучных

клетках (Goldie et al., 1986; Guc et al., 1988; Aoki et al., 1999). При их активации происходит изменение транспорта внутриклеточного  $Ca^{2+}$  и сокращение мышцы (Chand, Eyre, 1980; Florio и др. 1992; Cardell, Edvinsson, 1994) и изменение метаболизма фосфолипидов (Hall et al., 1988).

*Взаимодействие гистамина с гладкой мышцей* Стимуляция H1-рецепторов вызывает сокращение гладких мышц бронхов, повышение проницаемости сосудов, усиление секреторной активности желез. Бронхосуживающий эффект гистамина может осуществляться путем вагальных рефлексов с участием автономных нервных центров продолговатого мозга (Claes-Roland, 1987; Birumachi et al., 1998; Costello et al., 1999), за счет аксон-рефлексов (Lai, 1991; Barnes, 1986; 1991) или рефлексов, замыкающихся на уровне интрамуральных нервных образований (Федин и др., 1997). При этом малые дозы действуют рефлекторно, большие - непосредственно действуют на мышцу (Федин). Гистамин-вызванная бронхоконстрикция, опосредованная прямым эффектом на гладкую мышцу, кроме того, может явиться следствием повышенной вагально опосредованной бронхоконстрикции, вызванной дисфункцией M2 авторецепторов, которая зависит от выделения основного белка из эозинофилов, что наблюдается у пациентов с астмой (Belmonte 2005).

Активация H2-рецепторов, стимулирует синтез циклического аденозин монофосфата (цАМФ) в гладкомышечных клетках и расслабление мышцы; H2-рецепторы реагируют на низкие концентрации гистамина (Florio и др. 1992). Кроме этого стимуляция H2-рецепторов связана с усилением секреции, повышением проницаемости и расширением сосудов, образованием слизи в дыхательных путях. Предотвратить реакцию на введение гистамина можно только при одновременном применении H1- и H2-блокаторов, блокада рецепторов только одного типа не всегда бывает эффективной. На тучных клетках H2-рецепторы участвуют в отрицательной обратной связи, контролируя выделение гистамина.



*Взаимодействие гистамина с эпителием.* Эпителиальные клетки под действием гистамина способны синтезировать различные релаксанты (в том числе простагландины E1 и E2), которые расслабляют гладкую мускулатуру дыхательных путей. Эти эффекты гистамина опосредуются H1-рецепторами (Aoki et al., 1998). Кроме того, гистамин стимулирует производство простагландина PGF2 в эпителиальной и неэпителиальной ткани, возможно в гладкой мышце (Knight 1997). Простагландины и другие активные метаболиты арахидоновой кислоты модулируют влияние гистамина на гладкомышечные клетки (Folkerts, 1989). Удаление эпителия приводит к увеличению чувствительности дыхательных путей к гистамину без увеличения максимального ответа (Goldie et al., 1986; Jacques et al., 1992; Aoki et al., 1998).

H3-рецепторы связаны с НАНХ тормозной системой и располагаются на соматических ганглионарных нейронах и/или на постганглионарных тормозных нервных окончаниях (Ischinose et al., 1989) и модулируют выделение из них медиатора (Burgaud, Oudart, 1993).

**Серотонин.** Серотонин – медиатор, вовлеченный в регуляцию многих физиологических функций. На периферии серотонин синтезируется и выделяется тучными клетками, базофилами, тромбоцитами и энтерохромаффинными клетками. Показано увеличение внеклеточных уровней этого амина во время воспаления (Barnes et al., 1998). Кроме того, показана роль серотонина как иммуномодулятора, регулирующего производство цитокинов. (Dürk et al., 2005; Bayer et al., 2007). Серотонин вызывает бронхоконстрикцию у многих видов млекопитающих, но не у здоровых или астматических людей (Barnes et al., 1998). У мышей серотонин вызывает бронхоконстрикцию, чувствительную к атропину (Eum et al., 1999), то есть механизм его действия может зависеть от холинергических парасимпатических нервных волокон (Moffatt et al., 2004).

Имеется большое число рецепторов к серотонину. Подгруппа 5-HT<sub>1</sub> состоит из пяти подтипов, 5-HT<sub>2</sub> рецептор включает три подтипа, 5-HT<sub>3</sub> -

лиганд-вентильный катионный канал, рецептор 5-HT<sub>4</sub> имеет два варианта, имеются еще 5-HT<sub>5</sub>, 5-HT<sub>6</sub> и 5-HT<sub>7</sub> (Bayeret al., 2007). Активация серотониновых рецепторов вызывает деполяризацию холинергических нервных терминалей дыхательных путей через 5-HT<sub>3</sub> рецепторы (лиганд-вентильный ионный канал) у человека и морской свинки. Однако при активации серотонин вызывает выпуск ацетилхолина из эпителия, а не из нервов, поэтому ацетилхолин эпителия может быть медиатором анафилактической бронхоконстрикции у мышей и может играть роль в измененной реакции дыхательных путей при их болезни (Moffatt et al., 2004).

Серотонин стимулирует разные сигнальные пути и регулирует выделение цитокинов в эпителиальных клетках дыхательных путей. Он модулирует выпуск интерлейкинов IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8/CXCL8, IL-12p40 и фактор некроза опухоли (TNF). (Dürk et al., 2005). Выявлена патофизиологическую роль серотонин в астматических воспалительных ответах в эпителиальных клетках дыхательных путей человека (Bayeret al., 2007). Удаление эпителия заметно уменьшало сократительный ответ на серотонин. Серотонин, действующий на 5-HT(2A) рецепторы в эпителиальных клетках трахеи мыши, стимулирует эти клетки, чтобы выпускать ацетилхолин, который затем вызывает сокращение гладкой мышцы (Moffatt et al., 2004).

### **Аденозин.**

Аденозин, 6-Амино-9-бета-D-рибофуранозил-9H-пурин, — эндогенный нуклеозид, присутствующий во всех клетках организма в составе РНК и некоторых коферментов (НАД, НАДФ, КоА, ФАД). Нуклеозид состоит из пуринового основания аденина и углевода рибозы. Свободный аденозин образуется при распаде АТФ, РНК и адениновых нуклеотидов. Аденозин синтезируется после активации тучных клеток и является трансммиттером поздней фазы дегрануляции. Также аденозин появляется во внеклеточном пространстве вследствие разрушения клеток при действии различных повреждающих факторов. Из клеток во

внеклеточное пространство высвобождается АТФ, который быстро превращается в АМФ при участии внеклеточной эктонуклеотиддифосфорилазы. АМФ быстро трансформируется в аденозин при участии экто -5'- нуклеотидазы (ecto-5'-nucleotidase) или CD73 (Linden, Eltzschig, 2007). Внеклеточный аденозин транспортируется обратно в клетки при участии нуклеозидного транспортера, такого как ENT1 (Zhou Y., Schneider D. J., Blackburn M. R., 2009). Аденозин является как аутокринной, так и паракринной сигнальной молекулой и взаимодействует с трансмембранными рецепторами 4 подтипов:  $A_1R$ ,  $A_{2A}R$ ,  $A_{2B}R$ , and  $A_3R$  (Varani, Caramori, Vincenzi F, 2006). Соотношение этих рецепторов и локализация на мембранах различных клеток достаточно вариабельна (Zhong, Belardinelli, 2009; Vass, Horváth, 2008; Anvari, Sharma, 2010). Рецепторы  $A_1$ ,  $A_2$  и  $A_3$  взаимодействуют с различными G-белками: рецепторы  $A_1$  и  $A_3$  – с Gi/o-белком, а рецептор  $A_2$  – с Gs-белком. Кроме того, имеются данные, что все аденозиновые рецепторы могут взаимодействовать и с другими G-белками (Auchampach, Gross, 2005; Baraldi, Cacciari, 2000; Brown, Ollerstam, 2009; Dunwiddia, Fredholm, 2011). Рецепторы  $A_1$  и  $A_3$  являются ингибиторами аденилатциклазы, а рецепторы  $A_2$  – стимуляторами. После активации G-белков активируются определенные ферменты и ионные каналы и запускается каскад сложных биохимических превращений (Ferre, Popoli, 1994; Winchilli, Elswick, 2007).

В тучных клетках присутствуют аденозиновые рецепторы  $A_{2B}$  и  $A_3$ , которые, будучи активированными, облегчают антигенобусловленную дегрануляцию тучных клеток. Использование неселективного антагониста аденозиновых рецепторов теофиллина широко применяется при лечении астмы, хотя механизм его действия на систему GPCR до конца не ясен (Baraldi, Cacciari, 2000). Гетерогенность аденозиновых механизмов прежде всего определяется субтипом рецептора. Взаимодействие с рецепторами субтипа  $A_{2B}$  приводит к высвобождению гистамина, что ведет к сокращению гладкой мускулатуры (Anvari, Sharma, 2010). Сформулированы

представления об изменении соотношения количества пуриnergических рецепторов разных подтипов. В частности, показано увеличение уровней транскриптов для  $A_{2A}R$  and  $A_3R$  при снижении  $A_{2B}R$  у больных хронической обструктивной болезнью легких (Varani, Caramori, 2006).

В результате присоединения аденозина в качестве лиганда к рецепторам тучных клеток  $A_1$  и  $A_3$  активируется мембраносвязанный фермент - фосфолипаза  $C$ , а к рецепторам  $A_2$  - аденилатциклаза (Каркищенко, 1993). Эти ферменты катализируют реакции с образованием соответственно инозитол-1,4,5-трифосфата, 1,2- диацилглицерина и цАМФ. Инозитол-1,4,5-трифосфат и цАМФ обеспечивают фосфорилирование и активацию  $Ca^{2+}$ -связывающего белка кальмодулина, мобилизующего выход  $Ca^{2+}$  из эндоплазматического ретикулума клеток в цитоплазму, в присутствии которого при участии цАМФ и 1,2-диацилглицерина активируется протеинкиназа  $C$ . Протеинкиназа  $C$  осуществляет фосфорилирование и активацию ряда других внутриклеточных ферментов, в частности  $Ca^{2+}$ -зависимой фосфолипазы  $A_2$ . При этом за счет  $Ca^{2+}$ -индуцированного сокращения микротрубочек гранулы «подтягиваются» к плазматической мембране, а 1,2-диацилглицерин и активация фосфолипазы  $A_2$  обуславливают слияние депонирующих гранул тучной клетки со стенкой мембраносвязанных канальцев и цитоплазматической мембраной, через которые медиаторы гранул (первичные) и медиаторы, образующиеся при активации клеток, высвобождаются наружу. Медиаторы быстрой фазы дегрануляции воздействуют на гладкую мускулатуру трахеи и бронхов, вызывая сокращение миоцитов.

В гладкой мышце при присоединении аденозина к  $A_1$  и  $A_3$  рецепторам миоцитов запускаются механизмы ингибирования аденилатциклазы, - фермента, обеспечивающего гидролиз АТФ до цАМФ. Инактивация аденилатциклазы приводит к уменьшению концентрации цАМФ в цитоплазме миоцитов. При низкой концентрации цАМФ не происходит фосфорилирования киназы легких цепей миозина. При одновременном

увеличении концентрации ионов кальция в цитоплазме активируется белок цитоплазмы миоцитов – кальмодулин. Активация осуществляется за счет связывания кальмодулина с катионами кальция. Активный комплекс - кальций-кальмодулин С связывается с киназой легких цепей миозина и активирует этот фермент, вследствие удаления с ингибиторного участка фермента ингибирующие его активность протеинов и фосфат-анионов. Активная киназа легких цепей миозина фосфорилирует легкую цепь миозина, вследствие чего последняя соединяется с тяжелой цепью миозина, после чего миозиновые нити соединяются с нитями актина, образуя акто-миозиновый комплекс и вызывая гладко-мышечное сокращение (Гусев, 2000; Pollack, 1990).

Аденозин влияет также на эпителий и капсаицин-чувствительные С-волокна. На С-волокна аденозин оказывает возбуждающее действие, вследствие чего волокна синтезируют медиаторы возбуждающего действия – тахикинины (Undem, Kollarik, 2005).

**Арахидоновая кислота.** Арахидоновая кислота образуется из липидов мембраны под действием фосфолипазы А<sub>2</sub>. Существует два основных пути метаболизма арахидоновой кислоты — циклоксигеназный и липоксигеназный. Циклоксигеназный путь приводит к образованию простагландинов и тромбоксана А<sub>2</sub>, липоксигеназный — к образованию лейкотриенов. В тучных клетках легких синтезируются как простагландины, так и лейкотриены, в базофилах — только лейкотриены.

**Простагландины.** Первым среди играющих роль в аллергических реакциях немедленного типа и воспалении продуктов окисления арахидоновой кислоты по циклоксигеназному пути появляется простагландин D<sub>2</sub>. Он образуется в основном в тучных клетках. Появление простагландина D<sub>2</sub> в сыворотке свидетельствует о дегрануляции и развитии ранней фазы аллергической реакции немедленного типа. Синтез остальных продуктов циклоксигеназного пути — простагландинов F<sub>2</sub>альфа, E<sub>2</sub>, I<sub>2</sub> и тромбоксана А<sub>2</sub> — осуществляется различными ферментами. Простагландин

F2 альфа потенцировал сокращения, вызванные пре- и постганглионарным стимулированием трахеи кролика, а простагландин D2 дозо-зависимо тормозил каждую форму вызванного сокращения (Armour et al., 1988). Тормозная функция эпителия на сокращения гладкой мышцы трахеи кролика, вызванные электрической стимуляцией или внешним ацетилхолином, могла быть частично объяснена активностью нейтральной эндопептидазы, ограничивающей возбуждающие эффекты тахикининов в холинергических ответах. Изменение активности нейтральной эндопептидазы в результате воспалительных ответов и повреждение эпителия может содействовать механизму гиперреактивности патогенезу в астмы (Loenders et al., 1996).

Однако имеются данные, что эпителий дыхательных путей не оказывает тормозного влияния на выпуск ацетилхолина из парасимпатических нервов трахеи крысы. Кроме того, если эпителий-зависимая модуляция холинергической передачи происходит в трахее, тогда механизм не включает фосфорилхолин, окись азота, супероксидные радикалы, циклооксигеназу продукт арахидоновой кислоты, капсаицин чувствительные нейропептиды или ВИП (Vlahos et al., 2000).

**Протеогликаны.** Гранулы тучных клеток содержат гепарин и хондроитинсульфаты — протеогликаны с сильным отрицательным зарядом. Они связывают положительно заряженные молекулы гистамина и нейтральных протеаз, ограничивая их диффузию и инактивацию после высвобождения из гранул.

**Факторы хемотаксиса.** Дегрануляция тучных клеток приводит к высвобождению факторов хемотаксиса, которые вызывают направленную миграцию клеток воспаления — эозинофилов, нейтрофилов, макрофагов и лимфоцитов. При аллергических реакциях немедленного типа из тучных клеток высвобождаются и другие медиаторы, вызывающие направленную миграцию нейтрофилов, например высокомолекулярный фактор хемотаксиса нейтрофилов и лейкотриен B<sub>4</sub>. Привлеченные в очаг воспаления нейтрофилы

вырабатывают свободные радикалы кислорода, которые вызывают повреждение тканей.

**Лейкотриены.** Синтез лейкотриенов тучными клетками человека в основном происходит при аллергических реакциях немедленного типа и начинается после связывания антигена с IgE, фиксированными на поверхности тучных клеток. Лейкотриены C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> и E<sub>4</sub> раньше объединяли под названием «медленно реагирующая субстанция анафилаксии», поскольку их высвобождение приводит к медленно нарастающему стойкому сокращению гладких мышц бронхов и желудочно-кишечного тракта. Ингаляция лейкотриенов C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> и E<sub>4</sub>, как и вдыхание гистамина, приводит к бронхоспазму. Однако лейкотриены вызывают этот эффект в 1000 раз меньшей концентрации. В отличие от гистамина, который действует преимущественно на мелкие бронхи, лейкотриены действуют и на крупные бронхи. Лейкотриены C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> и E<sub>4</sub> стимулируют сокращение гладких мышц бронхов, секрецию слизи и повышают проницаемость сосудов. У больных atopическими заболеваниями эти лейкотриены можно обнаружить в слизистой носа. Разработаны и с успехом применяются для лечения бронхиальной астмы блокаторы лейкотриеновых рецепторов — монтелукаст и зафирлукаст.

**Фактор активации тромбоцитов (ФАТ).** ФАТ синтезируется в тучных клетках, нейтрофилах, моноцитах, макрофагах, эозинофилах и тромбоцитах. Фактор активации тромбоцитов — мощный стимулятор агрегации тромбоцитов. Ингаляция фактора активации тромбоцитов вызывает сильный бронхоспазм, эозинофильную инфильтрацию слизистой дыхательных путей и повышение реактивности бронхов, которая может сохраняться в течение нескольких недель после однократной ингаляции. Из дерева гинкго выделен ряд алкалоидов — природных ингибиторов фактора активации тромбоцитов. В настоящее время на их основе разрабатываются новые лекарственные средства. Роль фактора активации тромбоцитов в патогенезе аллергических реакций немедленного типа заключается также в

том, что он стимулирует агрегацию тромбоцитов с последующей активацией фактора XII (фактора Хагемана). Активированный фактор XII, в свою очередь, стимулирует образование кининов, среди которых наибольшее значение имеет брадикинин, вызывающий длительный бронхоспазм.

#### **1.4.4 Взаимодействия тучных клеток и гладкой мышцы**

В настоящее время гладкой мышце отводится большая роль в развитии каскада событий, являющихся причиной астмы благодаря ее способности секретировать большое число воспалительных цитокинов, пролиферировать в ответ на соединения, секретлируемые другими клетками в респираторном тракте и экспрессировать молекулы адгезии на свою поверхность и тем самым привлекать воспалительные клетки. (Christopher. Brightling, год.) Медиаторы, выделяемые тучными клетками способны изменять функциональные и фенотипические свойства гладкой мускулатуры. Экзоцитируемая лангганцитами триптаза и провоспалительные цитокины, такие как TNF- $\alpha$  (фактор некроза опухоли), стимулируют продукцию TGF- $\beta$ 1 (трансформирующий ростовой фактор) и в меньшей степени SCF (стволовой клеточный фактор) клетками гладкой мускулатуры, которые стимулирует тучноклеточный хемотаксис (Annaïg Ozier, Benoit Allard, 1998). TGF- $\beta$ 1 способствует клеточной дифференциации гладкой мышцы в направлении к сократительному фенотипу, характеризуемого повышенной экспрессией  $\alpha$ -актина и повышенной сократительной способностью. SCF – хемоаттрактант для тучных клеток и ответственен за регуляцию их роста, развития и функционирования. (Christopher, Brightling, 1997)

Тучные клетки могут вступать в адгезию к гладкой мышце. Этой адгезии изначально приписывали взаимодействие «клетка-клетка» с вовлечением Ig памяти, которая связана с клеточной адгезивной молекулой (cell adhesion molecule 1 (CADM1)), изначально известной как опухолевый супрессор 1 (tumor suppressor in lung cancer 1 (TLSC-1)). Однако,



блокирование CADM1 привело только к частичной редукции в адгезии тучных клеток к гладкой мышце, что предполагает наличие дополнительных механизмов, таких как молекулы, способствующие адгезии CD44 и CD51. Эта адгезия усиливается в условиях воспаления (Christopher, Brightling, 1997; Ozier, Allard, 1998). Когда тучные клетки дегранулируют в ответ на раздражитель, миоциты отвечают раздражением. Высвобождаемые миоцитами и тучными клетками цитокины, привлекают дополнительное количество воспалительных клеток в респираторный тракт. Они увеличивают экспрессию молекул адгезии на поверхности гладкой мышцы, увеличивают адгезию воспалительных клеток и увеличивают их пролиферацию. Ростовый фактор и триптаза являются причиной пролиферации гладкой мускулатуры, увеличивая способность мышцы к сокращению. Триптаза так же индуцирует гладкомышечный кальциевый ответ и респираторную гиперреактивность к гистамину. Число тучных клеток внутри гладкомышечного слоя положительно коррелирует со степенью респираторной гиперреактивности и с толщиной  $\alpha$ -гладкомышечного актина. Ассоциация между лаброцитами и миоцитами может быть одной из главных характеристик обструктивной болезни (Christopher, Brightling, 1997).

### **1.5. Нейро-иммунные отношения в нижних дыхательных путях**

Действие аллергенов и вирусов направлено на иммунокомпетентные клетки (тучные клетки и клеточные элементы крови), которые, выделяя медиаторы воспаления, также приводят к гиперреактивности гладкомышечной стенки дыхательных путей, усилению секреции слизи и увеличению проницаемости сосудов и к развитию иммунногенного воспаления.

Полютанты (табачный дым, диоксид серы, диоксид азота и др.) оказывают влияние на С-волокна в результате чего выделяются тахикинины, генерируются потенциалы действия, возбуждающие нейроны функционального модуля. Последние выделяют ацетилхолин. Тахикинины и

АХ активируют гладкую мышцу, эпителий и сосуды, наблюдается гиперактивность гладкомышечной стенки дыхательных путей, усиление секреции слизи и увеличивается проницаемость сосудов. В результате развивается нейрогенное воспаление.

Анатомическая близость нервных структур интрамурального ганглия и тучных клеток определяет возможность нейро-иммунных взаимодействий, когда медиаторы тучных клеток, выделяемые в экстрацеллюлярное пространство, оказывают влияние на нервные структуры. В свою очередь нервные структуры выделяют за пределы синаптической щели медиаторы и оказывают влияние на тучные клетки. Таким образом, периферийные нервные структуры и иммунный комплекс участвуют в развитии сравнимого воспалительного повреждения дыхательных путей (Myers, Undem, 1995).

### **1.5.1. Влияние тучных клеток на нейроны**

Аллергены и вирусная инфекция легких увеличивают экспрессию тахикининов в ганглиях блуждающего нерва. Воспалительные стимулы вызывают изменение в сенсорных нейронах. Это обеспечивает механизм, посредством которого бронхоконстрикция, гиперсекреция, нейрогенное воспаление и повышенная сосудистая проницаемость (все функции тахикининов) могут быть нарушены. Обработка ИЛ-1 изолированных сегментов дыхательных путей повышала сокращения на холинергическую стимуляцию. Ответы блокировались истощением тахикининов или антагонистом NK-1 рецептора. Возможно, что ИЛ-1, действуя синергически с фактором некроза опухоли, стимулирует экспрессию нервного фактора роста в эпителиальных клетках. Т. о. ИЛ-1, усиленно выделяемый при воспалении дыхательных путей, может быть важным посредником нервной пластичности дыхательных путей через свою способность порождать нервный фактор роста, который повышает экспрессию гена тахикининов. У овалбумин (ОА)-сенситизированных морских свинок экспозиция табачного дыма в большей

степени усиливала ответы С-волокон и быстро адаптирующихся рецепторов на капсаицин и брадикинин, чем у несенсибилизированных (Dale, 2001).

Нижние дыхательные пути оснащены рецепторами к основному продукту тучно-клеточной дегрануляции – гистамину (Ischinose et al., 1989). На сенсибилизированных морских свинках показано, что гистамин, освобожденный во время реакции гиперчувствительности немедленного типа имеет прямое воздействие через активацию H1-рецепторов на нейроны парасимпатических ганглиев бронхов (Myers, Undem, 1995), а на ВАНХ нервах расположены H3-рецепторы, которые тормозят выпуск медиатора из этих нервов (Ichinose, Barnes, 1989). Недавние исследования, проведенные на пищеводе, (Yu, Kollarik, 2007), показали, что активация тучных клеток ведет к увеличению возбудимости локальных сенсорных С-волокон. После сенсибилизации организма овальбумином в ткани наблюдалась значительное увеличение возбудимости С-волокон: наблюдалось 2-3-кратное возрастание частоты потенциалов действия.

Антиген-индуцированное освобождение гистамина стимулирует сенсорные нервы в отношении выработки тахикининов – нейрокинина А и субстанции Р, которые содействуют аллергической реакции. Антигенная активизация тучных клеток оказывает возбуждающее влияние на парасимпатические нервы (Myers, Undem, 1991; Undem, 2001). Парасимпатические нейроны метасимпатического ганглия респираторного тракта непосредственно иннервируются тахикинин-содержащими сенсорными волокнами. Следовательно, порожденное увеличение возбудимости сенсорных волокон может увеличить парасимпатическое влияние на гладкую мускулатуру трахеи и бронхов, запуская центральные и периферийные рефлекторные дуги. Кроме того, стимулирование антигеном тучных клеток имеет прямые эффекты в возбудимости парасимпатических нейронов ганглия в результате прямого влияния гистамина на H1-рецепторы. Таким образом, повышенная электрическая активность парасимпатических нервов может быть последствием аллергической реакции в системе

респираторного тракта. (Undem, Riccio, Weinreich, 1995)

Косвенно на нервные компоненты системы респираторного тракта влияют тучноклеточные протеазы – химаза и триптаза – играющие одну из ключевых ролей в нейро-иммунных механизмах. Данные протеазы оказывают влияние на трансммиттерные продукты неадренэргических нехолинэргических нервов. Триптаза деградирует и инактивирует вазоактивный интестинальный пептид (Said, 1987), что является причиной уменьшения бронхиальной релаксации и потенциальным базисом увеличения бронхострикции при астме. (Matsuzaki, Hamasaki, 1980). Бронхоконстриктурирующую нейропептидную субстанцию Р триптаза не гидролизует, несмотря на присутствие потенциального триптичного сайта расщепления (Caughey, Leidig, 1988). Химаза тучных клеток расщепляет оба нейропептида – вазоактивный интестинальный пептид и субстанцию Р (Caughey, Lazarus, Viro, Gold, 1988), однако, химаза обладает меньшей протеолитической активностью (Franconi, Graf, 1989). Подобные исследования подтверждают потенциальную роль тучноклеточных протеаз в модуляции нейронального воздействия на гладкую мышцу.

Возможный механизм развития гиперреактивности бронхов при вирусной инфекции представлен в табл. 1.

Таблица 1. Механизмы развития синдрома гиперреактивности бронхов при вирусной инфекции

Воздействие вирусного агента на слизистую оболочку дыхательных путей	Возможные последствия
Повреждение и десквамация мерцательного эпителия дыхательных путей, "оголение" ирритативных рецепторов	Повышение пороговой чувствительности ирритативных рецепторов; угнетение мукоцилиарного клиренса

Снижение функциональной активности мерцательного эпителия вплоть до "паралича" цилиарного аппарата	Мукостаз - задержка выведения воспалительного секрета
Воздействие на субэпителиальные чувствительные клетки - активация нервно-рефлекторных механизмов	Гиперчувствительность ирритативных рецепторов к ацетилхолину, гистамину, холодному воздуху, поллютантам окружающей среды
Нарушение гомеостатического равновесия между адренергической и холинергической иннервацией	Формирование гиперреактивности бронхов у здоровых и обострение бронхиальной астмы у больных детей
Дисбаланс парасимпатической регуляции, обусловленный повышенным выделением ацетилхолина	Развитие рецидивирующего обструктивного бронхита, "имитирующего" таковой инфекционного генеза; развитие бронхообструктивного синдрома на повышенную физическую нагрузку
Адренергический дисбаланс: снижение бета-адренергической активности или возрастание альфа-адренергической активности	Развитие бронхообструктивного синдрома при вдыхании холодного воздуха
Усиление действия субстанции Р (бронхоконстрикторный эффект) и усиление воспаления	Развитие приступов "беспричинного пароксизмального кашля"

### 1.5.2. Влияние нейронов на тучные клетки

Kiernan JA (1990) в своих экспериментах показал, что электрическая стимуляция вагусных нервов препаратов трахеи и бронхов крысы в течение трех минут вызывала увеличение процента дегрануляции тучных клеток от 35-40% до 48-55%. Дегрануляция тучных клеток прекращалась после перерезки нервных путей. Предварительная обработка препаратов капсаицином так же предотвращала дегрануляцию, которая ранее следовала за стимуляцией вагусных нервов. Эти наблюдения идентифицировали, что тучные клетки высвобождают содержимое их гранул в ответ на электрическую активацию капсаицин-чувствительных С-волокон и парасимпатических нервов (Kiernan, 1990). Вероятно, тучные клетки реагируют на соединения, выбрасываемые при стимуляции этих нервов – ацетилхолин, субстанция Р, нейрокинин А. Эти транмиттеры при присоединении к рецепторам тучных клеток вызывает выделение гистамина из гранул в экстрацеллюлярные пространства дыхательных путей (Joos, Pauwels, 1988). Однако в экспериментах Leff и Stimler (1986) применение одной лишь парасимпатической стимуляции не вызывало секреции гистамина. Эти авторы показали, что вагусная нервная стимуляция вызывала секрецию гистамина из респираторных тучных клеток только при повышении чувствительности тучных клеток привведению антигена.

Вагусные афферентные С-волокна в условиях аллергической реакции усиливают синтез нейропептидов (субстанцию Р) в ядре солитарного тракта (Mutoh, Vonham, 2000). В условиях физиологической нормы это влияние минимально, поскольку сильно снижается способность вагусных нервов к синтезу нейропептидов (Myers, 2002).

В условиях патологии нейропептиды являются сильным IgE-независимыми активаторами тучных клеток, приводящими в их дегрануляции (Адельман, Сэксон, 2000). Тучные клетки содержат на наружной мембране адренэргические рецепторы, однако влияние на них

медиаторов симпатической нервной системы не является существенным, поскольку симпатическая иннервация представлена в системе нижних дыхательных путей незначительно.

Однако, касательно темы нашего исследования многие аспекты нейро-иммунных взаимодействий в системе нижних дыхательных путей остаются неизученными. Мало изучена роль тучных клеток в нижних дыхательных путях в состоянии физиологической нормы. Не раскрыты взаимные влияния тучных клеток и системы функционального модуля, а так же их совместное влияние на сокращения гладкой мускулатуры трахеи и бронхов. Не раскрыты в полной мере совместная роль эпителиальных простагландинов, С-волокон, стреч-рецепторов, нейронов интрамурального ганглия и частичной тучноклеточной дегрануляции в сокращении гладкой мышцы трахеи и бронхов в нормальных физиологических условиях.

## ГЛАВА 2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Были исследованы трахеи и бронхи 72 крысы линии Вистар обоего пола с массой тела 220-350 г. в возрасте двух – трех месяцев. Эвтаназию животных производили путем помещения животного в камеру с хлороформом.

### 2.1. Методика приготовления изолированных препаратов трахеи и бронхов

Животное крепили на препаровальном станке. Для получения изолированных препаратов трахеи и бронхов производили надрез кожи по средней линии с вентральной стороны шеи и груди, затем вскрывали грудную клетку. После этого извлекали трахею, легкие и сердце и помещали их в заполненную физиологическим раствором чашку Петри, где удаляли сердце и три наименьшие правые доли легкого. Затем бронхиальные стволы оставшихся долей освобождали от окружающей ткани примерно до 5-6-го разветвления бронхов и осуществляли разрез трахеи и бронхов в продольном направлении по вентральной стороне (противоположной залеганию гладкой мышцы трахеи). После этого вырезали сегменты длиной около 5 мм. Для опыта использовались шейные и грудные части трахеи и бронхи 2 – 4-го порядка с обязательным наличием места бифуркации (это связано с нахождением в области бифуркаций интрамуральных ганглиев). От каждого животного брали по четыре препарата трахеи и бронхов в различных комбинациях.

Выделенные сегменты трахеи и бронхов помещали в экспериментальные камеры с проточным аэрированным физиологическим раствором Кребса-Хензеляйта, объединенные в один термостатируемый блок. Температура раствора с помощью ультратермостата U10 поддерживалась в пределах  $37 \pm 0,5$  °С. Скорость протока физиологического раствора составляла 0,5 мл/мин. Объем экспериментальной камеры равен 2,5 мл. Схема установки приведена на рис. 2.1.

Изолированный сегмент трахеи или бронхов с одной стороны продольного разреза прикалывали вольфрамовыми иглами к основанию камеры, с другой – с помощью вольфрамового крючка и нити присоединяли к датчику, связанному с АЦП компьютера. Начальное натяжение препарата



составляло 500 мг. Препараты выдерживались в ванночке в течение 30 минут.

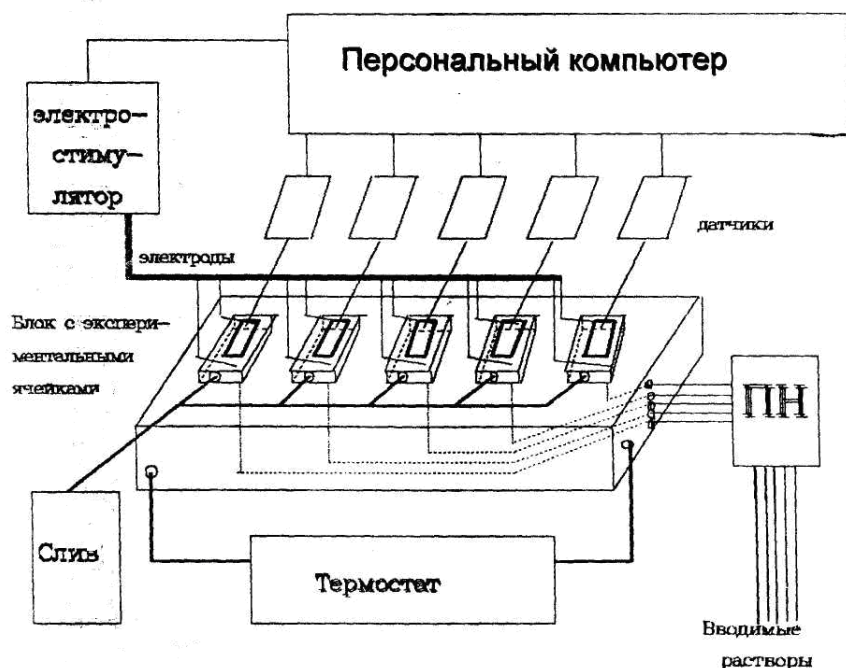


Рис. 2.1 Схема экспериментальной установки для регистрации сокращений гладкой мышцы изолированных сегментов трахеи и бронхов  
ПН - перистальтический насос.

## 2.2. Методика регистрации сократительной активности препарата

Исследовали изменение ответов гладкой мышцы трахеи и бронхов, вызванные электрической стимуляцией нервов или мышцы, на фармакологические препараты. В работе анализировали максимальную и минимальную амплитуду сокращения, латентный период сократительного ответа и амплитуду расслабления (Федин, 2010). Минимальная амплитуда сокращения может рассматриваться как дилатационный эффект, а максимальная – как констрикторный.

Регистрация сократительной активности проводилась в изометрическом режиме с помощью электромеханического датчика. Сокращение (напряжение) гладкой мышцы преобразовывалось в электрический сигнал, который поступал на ЭВМ для регистрации и дальнейшей обработки.

Раздражение препарата электрическим полем осуществляли с помощью стимулятора ЭСЛ-2. Серебряные электроды располагались вдоль продольной стенки ванночки по обе стороны препарата. При стимуляции преганглионарных нервов частота стимулов составляла 8 стим/с, длительность – 0,5 мс, амплитуда 20 В, продолжительность стимуляции – 10 с. При стимуляции постганглионарных нервов частота равнялась 30 стим/с, длительность – 0,5 мсек, амплитуда 20 В, продолжительность стимуляции 10 с. При стимуляции мышцы частота стимулов составляла 30 стим/с, длительность – 2 мс, амплитуда 20 В, продолжительность стимуляции – 10 с. Время между стимуляциями составляло 2,5 мин. Проводились опыты с различным количеством стимуляций в зависимости от целей конкретного эксперимента.

После каждого введения вещества препарат раздражали три раза и эффект определяли как среднее изменение параметров ответа из трех стимуляций. Параметры ответа первых трех стимуляций рассматривались как контрольный ответ, параметры ответа последующих двух групп стимуляций – как опытные. Таким образом, в каждой серии опытов была одна контрольная и несколько опытных группы стимуляций (рис. 2.2).

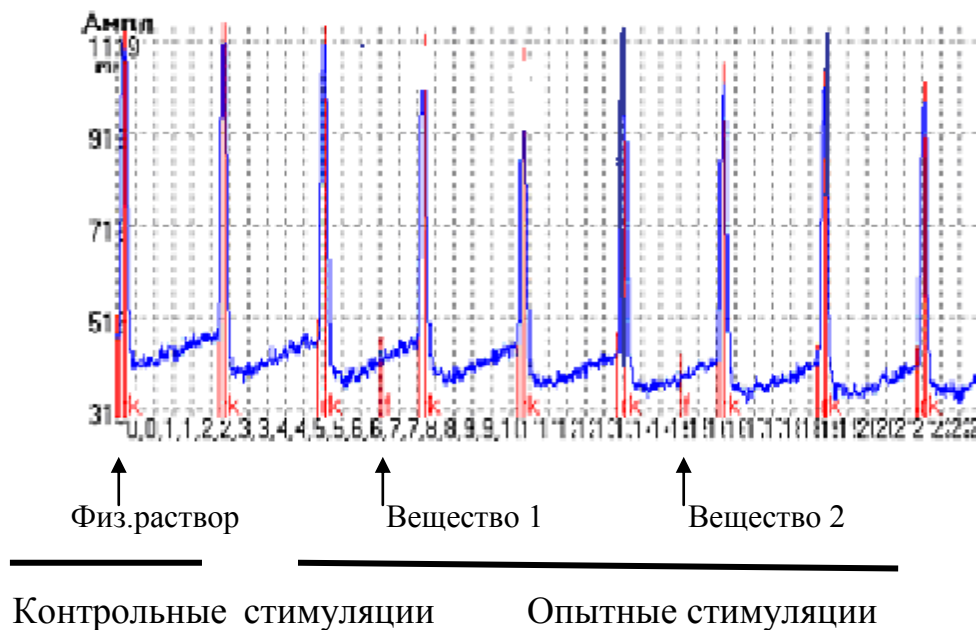


Рис. 2.2. Пример ответов гладкой мышцы трахеи в одной серии экспериментов.

По оси абсцисс – время эксперимента в минутах, по оси ординат – величина сокращения (напряжения) в миллиграммах.

Опыт проводился в автоматическом режиме по написанной программе, вручную по сигналу компьютера вводились в ванночку только исследуемые вещества.

### **3.3. Статистическая обработка результатов**

В исследовании вычислялись среднее значение признака и ошибка. Достоверность различий двух средних величин определяли по критерию Стьюдента. Обработка и анализ результатов проводились на персональном компьютере с помощью статистических программ Excel.

### **2.4. Дизайн исследования**

Эксперименты были разбиты на четыре этапа. Во время первого этапа исследовалась сократительная активность гладкой мускулатуры трахеи и бронхов на фоне перфузии физиологического раствора в ответ на стимуляцию преганглионарных, постганглионарных нервов и мышцы. Изучалось влияние аденозина и капсаицина на сокращения трахеи и бронхов. Результаты этого этапа исследования позволили определиться с выбором наиболее выгодного для экспериментов типа электрической стимуляции. Для последующих опытов была выбрана постганглионарная стимуляция.

Во всех опытах тучные клетки активировались аденозином, вследствие чего высвободившийся вследствие дегрануляции эндогенный гистамин оказывал влияние на все структуры нижних дыхательных путей. Для установления механизмов влияния тучно-клеточного гистамина применялись вещества, блокирующие различные структуры трахеи и бронхов (индометацин, супрастин, циметидин, капсаицин). Эффект влияния тучных клеток дополнялся электрической стимуляцией постганглионарных нервов, что имитировало естественные условия нейро-иммунных взаимодействий в нижних дыхательных путях живого организма. Активация С-волокон проводилась воздействием низких концентраций капсаицина.

На втором этапе исследования изучалась роль эпителиальных простагландинов в реакции гладкой мышцы при активации тучных клеток и С-волокон. Применялась блокада синтеза простагландинов индометацином на фоне действия аденозина и капсаицина.

На третьей ступени исследования выяснялась роль гистаминовых рецепторов в реакции гладкой мышцы при активации тучных клеток и С-волокон. Применялись блокатор H1-рецепторов супрастин и блокатор H2-рецепторов циметидин.

На четвертой ступени исследования выяснялась роль С-волокон, стреч-рецепторов, тучных клеток и ганглиев в реакции гладкой мышцы трахеи и бронхов. В экспериментах применяются ранее описанных фармакологических препаратов с добавлением стабилизатора мембран тучных клеток - кромогликата натрия, блокатора нервно-мышечной передачи атропина, и блокатора стреч-рецепторов новокаина. Данная часть исследования направлена на раскрытие особенностей нейро-иммунного действия на гладкую мышцу трахеи и бронхов.

После каждой серии эксперимента производили отмывание препаратов физиологическим раствором в течение 30 мин., после экспериментов с применением атропина перфузии физиологического раствора составляла 60 мин.

## **2.5. Фармакологические препараты, используемые в исследовании**

В ходе экспериментов экзогенно вводились следующие вещества: аденозин (10 мкг/мл) для активации тучных клеток, кромогликат натрия (100 мкг/мл) для стабилизации мембран лаброцитов, индометацин (10 мкг/мл) для блокады влияния эпителия, циметидин (100 мкг/мл) – для устранения эффектов, опосредованных H2-рецепторами, супрастин (100 мкг/мл) - для устранения эффектов, опосредованных H1-рецепторами, капсаицин (1 мкг/мл, в течение 30 минут) – с целью блокады капсаицин-чувствительных волокон, капсаицин (1 мкг/мл, аппликация (V=0,2 мл) – с целью активации С-волокон, новокаин (10 мкг/мл) - с целью исключения влияния быстро- и медленно-адаптирующихся стреч-рецепторов. Аденозин и капсаицин (при активации С-волокон) вводились в виде аппликаций (V=0,2 мл), все остальные вещества – в виде перфузии. Гистамин искусственным образом в систему не вводился. Поступление гистамина происходило естественным путем вследствие дегрануляции тучных клеток.

### ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На организм человека и животных оказывают постоянное воздействие различные внешние и внутренние факторы. В респираторном тракте внешние воздействия воспринимаются главным образом тучными клетками и чувствительными окончаниями С-нервов. Активация этих структур приводит к выделению различных медиаторов, осуществляющих модуляцию работы гладкой мышцы, нейронов интрамуральных ганглиев, тучных клеток, сосудов и других образований. Нейроны и тучные клетки оказывают влияния и друг на друга. В данной работе мы попытались рассмотреть роль нервных и иммунных образований в работе респираторного тракта через их влияние на сократительную активность гладкой мышцы, вызванной стимуляцией электрическим полем, то есть в условиях, приближенных к естественным. В первой части экспериментальной главы рассматривается изменение сократительной активности трахеи и бронхов при воздействии на них аденозина, влияющего на тучные клетки и на чувствительные нервные окончания С-волокон, и капсаицина, оказывающего воздействие только на С-волокна. Во второй и третьей частях данной главы исследуется роль эпителия и гистаминовых рецепторов в реакции гладкой мышцы, связанной с активацией С-волокон и тучных клеток. В последней части рассмотрена гладкомышечная активность на фоне блокады разных структур нейро-иммунных взаимодействий (С-волокон, тучных клеток и ганглиев). В экспериментах использовались низкие активирующие дозы аденозина (Zhou, 2009) и капсаицина, соответствующие умеренному воздействию отрицательных экологических факторов на респираторный тракт, и вызывающие колебания гладкомышечных сокращений в пределах физиологической нормы (Федин, 2010). Подобные эксперименты позволяют подробно раскрыть особенности нейро-иммунных взаимодействий, наблюдаемых в относительно благоприятных экологических условиях среды обитания организма.

### **3.1. Влияние стимуляции нервов и мышцы, аденозина и капсаицина на препараты гладкой мышцы трахеи и бронхов**

Препараты трахеи и бронхов представляет сложную структуру, состоящую из мышечной, нервной, эпителиальной и других тканей, находящихся во взаимодействии. Бронхоконстрикция гладкой мышцы может быть вызвана стимуляцией электрическим полем с применением различных параметров частоты и длительности стимулов. Благодаря этому, можно избирательно активировать непосредственно гладкомышечные клетки, постганглионарные или преганглионарные нервы и изучать воздействие фармакологических веществ на отдельные структуры респираторного тракта. Сокращение гладкой мускулатуры и развитие обструктивных явлений иммунного генеза может быть вызвано активацией тучных клеток с высвобождением медиаторов аллергической реакции немедленного типа. В экспериментальных условиях для активации тучных клеток мы использовали аденозин. Возбуждение афферентных С-волокон приводит к развитию сокращения гладкомышечных структур за счет рефлекторного воздействия через нейроны интрамуральных ганглиев и за счет выделения тахикининов, которые непосредственно активируют гладкую мышцу, а также другие структуры трахеи и бронхов. В условиях эксперимента активировать С-волокна можно применением электрической стимуляции преганглионарных нервов, а чувствительные нервные окончания воздействием низких концентраций капсаицина или аденозина.

#### **3.1.1. Активность гладкой мышцы трахеи и бронхов, вызванная стимуляцией нервов и мышцы**

Стимуляция электрическим полем вызывала сокращение гладкой мышцы нижних дыхательных путей (рис. 3.1). При раздражении преганглионарных нервов оно было наименьшим по величине, а при

раздражении мышцы, как правило, наибольшим. Однако в некоторых опытах ответы на стимуляцию постганглионарных нервов превышали ответы на мышечную стимуляцию.

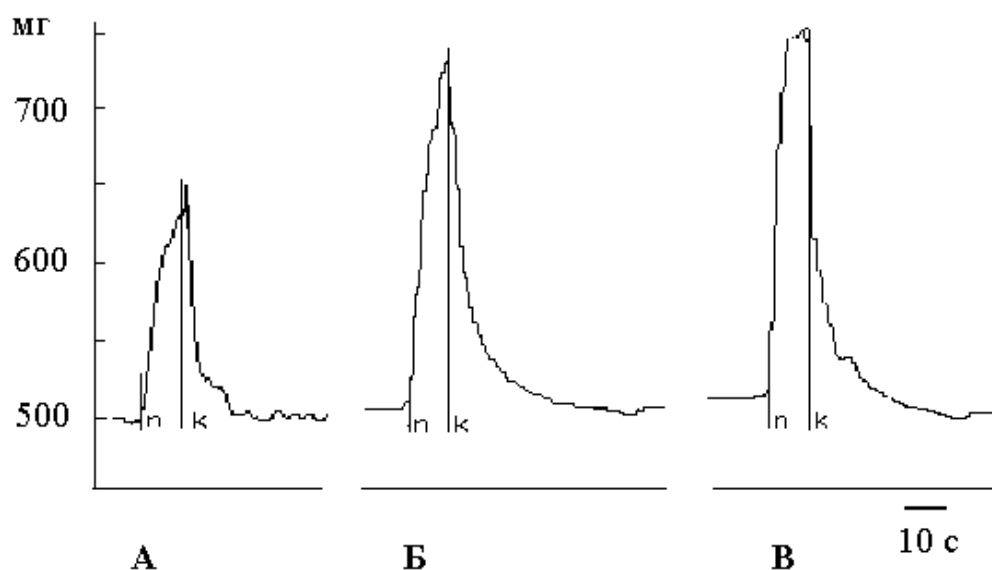


Рис. 3.1. Ответы гладкой мышцы трахеи при стимуляции преганглионарных (А) и постганглионарных (Б) нервов и мышцы (В).

По оси абсцисс – время сокращения гладкой мышцы; по оси ординат – амплитуда сокращения гладкой мышцы в мг.

«n» и «k» – начало и конец стимуляции. Калибровка – 10 с.

При стимуляции преганглионарных нервов регистрировались следующие средние величины сокращения: на препаратах трахеи с ганглиями –  $145,0 \pm 18,9$  мг, бронхов –  $181,7 \pm 20,8$  мг (рис. 3.2). При стимуляции постганглионарных нервов амплитуда сокращений гладкой мускулатуры возрастала и на препаратах трахеи составляла  $323,2 \pm 43,7$  мг, на бронхах –  $267,2 \pm 37,1$  мг. При стимуляции мышцы также

регистрировались высокие значения амплитуды сокращений. Ответы трахеи при этом виде стимуляции составляли  $280,8 \pm 32,8$  мг, бронхов –  $371,1 \pm 35,8$  мг; различия между показателями трахеи и бронхов были достоверны ( $P < 0,05$ ). Латентный период при электрической стимуляции преганглионарных нервов трахеи равнялся  $1,17 \pm 0,14$  с, бронхов –  $1,38 \pm 0,11$  с. При стимуляции постганглионарных нервов среднее значение величины латентного периода для трахеи составляло  $1,11 \pm 0,12$  с, для бронхов –  $1,28 \pm 0,08$  с. При электрической стимуляции мышцы трахеи значение латентного периода достигало  $0,81 \pm 0,10$  с, при стимуляции мышцы бронхов –  $0,90 \pm 0,07$  с. Различия в величинах латентного периода сокращения между трахеей и бронхами не достоверны.

Амплитуда расслабления при стимуляции преганглионарных нервов для трахеи равнялась  $11,0 \pm 1,3$  мг, для бронхов –  $8,6 \pm 1,3$  мг. Различия между расслаблением трахеи и бронхов недостоверны (рис. 3.3). При стимуляции постганглионарных нервов амплитуда расслабления составляла для трахеи  $13,2 \pm 1,4$  мг, для бронхов –  $12,0 \pm 1,4$  мг. При стимуляции мышцы среднее значение величины расслабления было наибольшим и у трахеи достигало  $15,9 \pm 2,2$  мг, у бронхов –  $17,4 \pm 1,9$  мг.



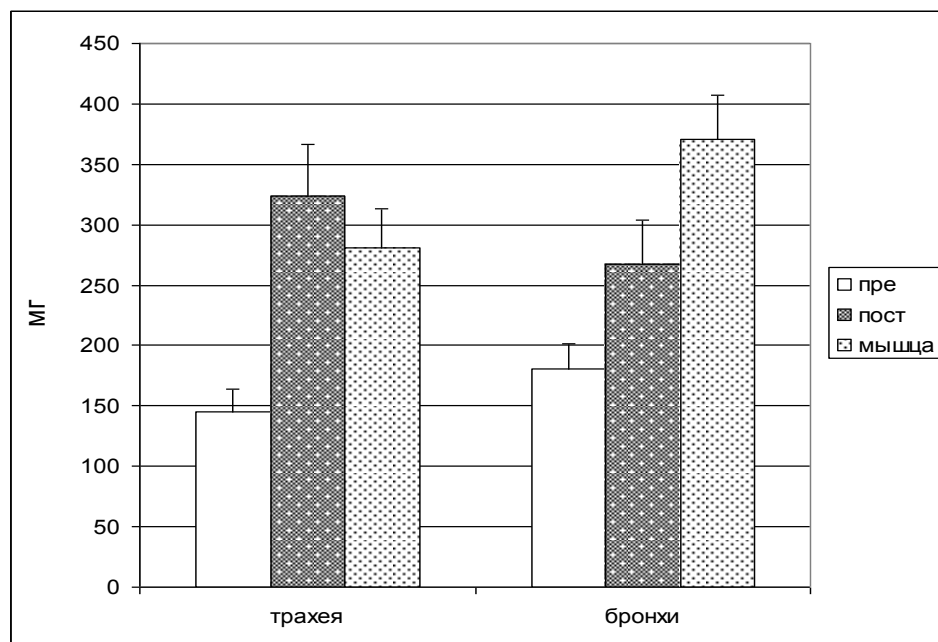


Рис. 3.2. Амплитуда сокращения гладкой мускулатуры трахеи и бронхов при стимуляции нервов и мышцы на фоне физиологического раствора

По оси ординат обозначены изменения ответов гладкой мышцы в мг  
«пре.» - стимуляция преганглионарных нервов  
«пост» - стимуляция постганглионарных нервов  
«мышца» - стимуляция мышцы

Различия между показателями расслабления трахеи и бронхов при стимуляции нервов и мышцы не достоверны.

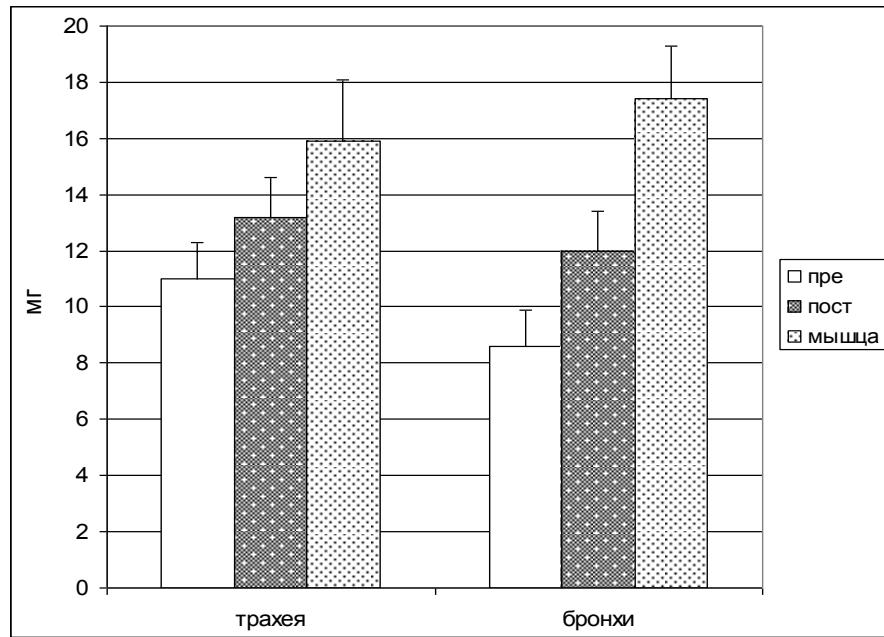


Рис. 3.3. Амплитуда расслабления гладкой мускулатуры трахеи и бронхов при стимуляции нервов и мышцы на фоне физиологического раствора.

По оси ординат обозначены изменения ответов гладкой мышцы в мг; «пре.» – стимуляция преганглионарных нервов; «пост» – стимуляция постганглионарных нервов; «мышца» – стимуляция мышцы.

### 3.1.2. Активность гладкой мышцы трахеи и бронхов при действии аденозина

Аппликация в ванночку 10 мкг аденозина вызывала двухфазное изменение ответов, вызванное стимуляцией нервов или мышцы, у изолированных препаратов трахеи и бронхов (рис. 3.4 и 3.5). При стимуляции преганглионарных нервов среднее усиление ответов гладкой мышцы трахеи до  $106,0 \pm 2,5$  % происходило на  $3,1 \pm 1,0$  минуте после введения аденозина, а снижение ответов до  $90,3 \pm 2,5$  % – на  $5,3 \pm 0,8$  минуте. При стимуляции постганглионарных нервов аденозин достоверно ( $P < 0,05$ ) усиливал сократительные ответы трахеи до  $110,4 \pm 4,8$  %. Снижение ответов трахеи во вторую фазу реакции достоверно не отличались от контроля ( $97,7 \pm 4,0$  %).

При стимуляции мышцы первая фаза усиления ответов гладкой мышцы трахеи на аденозин практически не выявлялась ( $105,2 \pm 2,0$  %). Во вторую фазу реакции величины сократительных ответов достоверно понижались ( $P < 0,05$ ) для трахеи до  $90,3 \pm 3,2$  %. При стимуляции мышцы время снижения сократительного у трахеи наступало на  $6,7 \pm 0,3$  минуте.

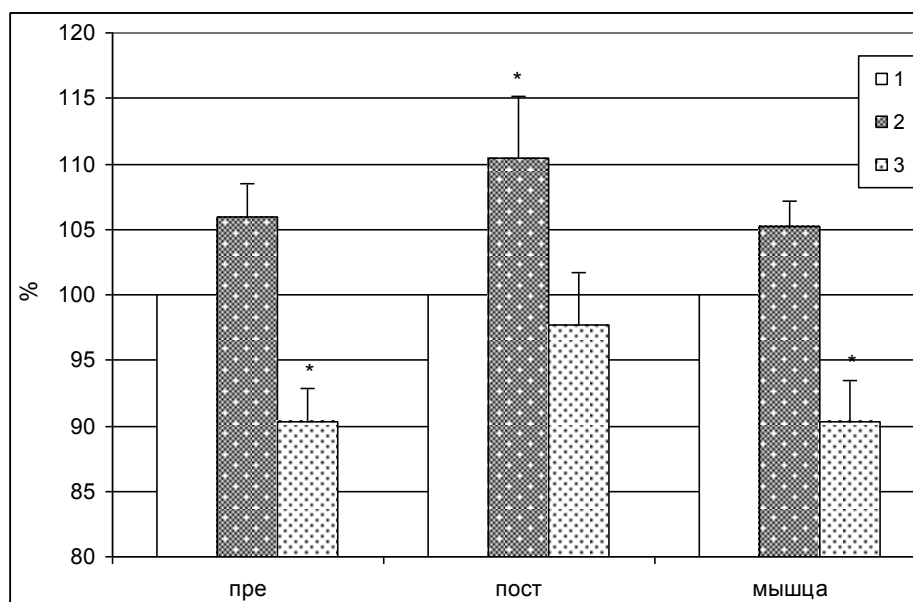


Рис. 3.4 Влияние аденозина на сократительную активность гладкой мышцы трахеи.

По оси абсцисс обозначены виды электрической стимуляции; «пре» – стимуляция преганглионарных нервов, «пост» – стимуляция постганглионарных нервов, «мышца» – стимуляция мышцы.

По оси ординат обозначены изменения ответов гладкой мышцы в %; За 100 % принят ответ гладкой мышцы без действия аденозина.

«1» – контроль; «2» – первая фаза действия аденозина; «3» – вторая фаза действия аденозина.

\* – достоверное ( $P < 0,05$ ) отличие от контроля.

При стимуляции преганглионарных нервов усиление ответов гладкой мышцы бронхов до  $108,4 \pm 3,0$  % наблюдалось на  $2,5 \pm 0,9$  минуте после введения аденозина, а снижение до  $91,5 \pm 3,0$  % – на  $5,5 \pm 0,9$  минуте (рис. 3.5). При стимуляции постганглионарных нервов аденозин на  $2,8 \pm 0,4$  минуте достоверно ( $P < 0,05$ ) усиливал сократительные ответы бронхов до

111,7±1,2 %. Снижение ответов бронхов во вторую фазу реакции на 4,0 ± 0,32 минуте доходило до 95,2 ± 0,8 % (P<0,05). При стимуляции мышцы первая фаза усиления ответов гладкой мышцы бронхов на аденозин практически не выявлялась (103,8 ± 2,5 %). Во вторую фазу реакции величины сократительных ответов достоверно понижались (P < 0,05) до 89,9 ± 2,8 %. При стимуляции мышцы время снижения сокращения у бронхов наступало на 5,3 ± 0,8 мин. Различий между изменениями амплитуды сокращения и наступлением первой и второй фазами реакции гладкой мышцы трахеи и бронхов не наблюдалось.

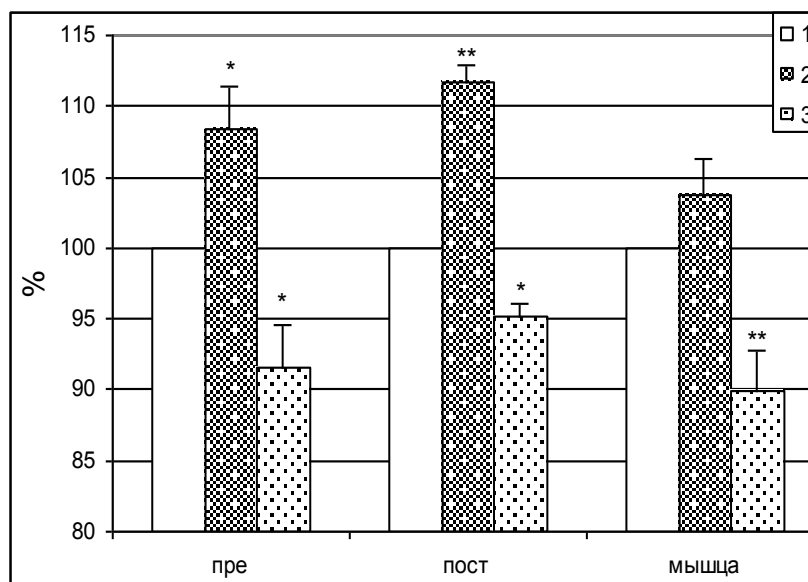


Рис. 3.5. Влияние аденозина на сократительную активность гладкой мышцы бронхов.

По оси абсцисс обозначены виды электрической стимуляции: «пре.» – стимуляция преганглионарных нервов, «пост» – стимуляция постганглионарных нервов, «мышца» – стимуляция мышцы.

По оси ординат обозначены изменения ответов гладкой мышцы в %. За 100 % принят ответ гладкой мышцы без действия аденозина.

«1» – контроль; «2» – первая фаза; «3» – вторая фаза действия аденозина

\* и \*\* – достоверное P<0,05; и P<0,01 отличие от контроля.

10 мкг аденозина достоверно не изменяли амплитуды расслабления гладкой мышцы трахеи и бронхов, вызванной электрическим раздражением

нервов или мышцы.

Таким образом, аденозин вызывал двухфазное действие на препараты трахеи и бронхов. Первая фаза – увеличение ответов регистрировалась при стимуляции преганглионарных нервов, вторая фаза – снижение ответов больше была выражена при стимуляции мышцы. Различия между ответами трахеи и бронхов касались только количественной стороны: аденозин усиливал сокращение на бронхах больше, чем на трахее.

### **3.1.3. Активность гладкой мышцы трахеи и бронхов при активации С-волокон капсаицином**

При всех видах электрического раздражения добавление в ванночку 1 мкг капсаицина вызывало двухфазный характер изменения ответов трахеи и бронхов. Сокращения трахеи при стимуляции преганглионарных нервов достигали максимума  $112,7 \pm 0,9$  % ( $P < 0,01$ ) на  $3,56 \pm 0,36$  мин после аппликации капсаицина в ванночку (рис. 3.6). К  $5,10 \pm 0,26$  минуте эксперимента ответы возвращались к норме. При стимуляции постганглионарных нервов или мышцы усиление ответов было меньше ( $107,9 \pm 2,1$  % и  $110,5 \pm 1,6$  %, соответственно), но зато была выражена вторая фаза реакции – снижение ответа, которое при стимуляции мышцы достигало  $90,6 \pm 1,8$  % ( $P < 0,05$ ) (рис. 3.6).

На препаратах бронхов при раздражении преганглионарных нервов эффект действия капсаицина наступал на  $2,75 \pm 0,44$  мин и составлял  $115,1 \pm 1,4$  % ( $P < 0,01$ ), а фаза снижения сокращения практически отсутствовала ( $95,9 \pm 2,2$  %) (рис. 3.7). При стимуляции постганглионарных нервов или мышцы усиление ответов было меньше ( $108,1 \pm 1,6$  %) и наступало на  $2,62 \pm 0,62$  мин. При стимуляции мышцы первая фаза практически отсутствовала ( $104,3 \pm 1,7$  %). Вторая фаза реакции – снижение ответа при стимуляции постганглионарных нервов на  $5,41 \pm 0,42$  мин составляла  $91,4 \pm 2,9$  %

( $P < 0,05$ ), при стимуляции мышцы –  $88,7 \pm 1,9$  % ( $P < 0,01$ ) на  $5,25 \pm 0,72$  мин (рис. 3.7).

Таким образом, препараты трахеи и бронхов практически одинаково реагировали на капсаицин. Более того, время эффекта капсаицина, связанного с повышением или снижением ответов, у этих препаратов достоверно не различалось.

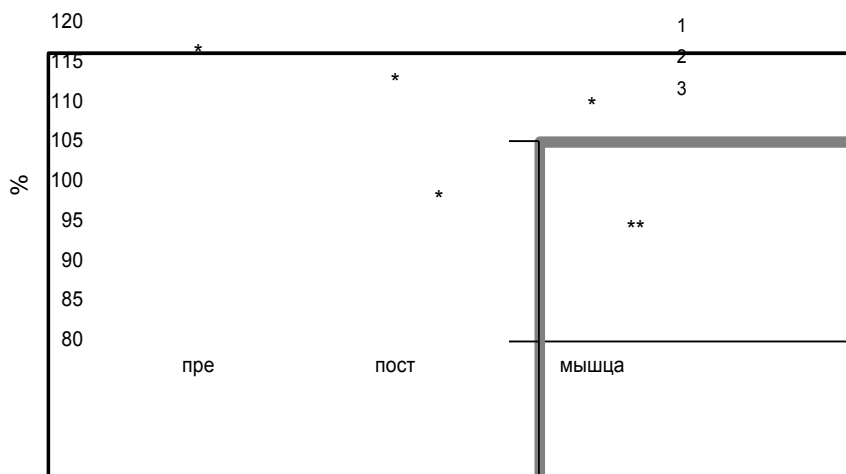


Рис. 3.6. Влияние капсаицина на сокращение трахеи

По оси абсцисс обозначены виды электрической стимуляции.

По оси ординат обозначены изменения ответов гладкой мышцы в %. За 100 % принят ответ гладкой мышцы без действия капсаицина.

«1» – контроль; «2» – первая фаза; «3» – вторая фаза действия капсаицина;

«пре.» – стимуляция преганглионарных нервов

«пост» – стимуляция постганглионарных нервов

«мышца» - стимуляция мышцы

\* и \*\* – достоверное отличие  $P < 0,05$  и  $P < 0,01$ , соответственно, от контроля.

При преганглионарной стимуляции капсаицин оказывал дилатационный эффект с наибольшими показателями расслабления на препаратах гладкой мышцы трахеи (с  $11,3 \pm 1,3$  мг до  $21,3 \pm 3,1$  мг;  $P < 0,01$ ). На бронхах дилатационный эффект был выражен в меньшей степени, но зато он проявлялся при преганглионарной (с  $8,6 \pm 1,3$  мг до  $15,5 \pm 2,8$  мг;  $P < 0,05$ ) и постганглионарной стимуляции (с  $10,6 \pm 1,4$  мг до  $14,3 \pm 2,1$  мг;  $P < 0,05$ ). При

стимуляции мышцы достоверных изменений расслабления не наблюдалось.

Предварительная экспозиция препаратов трахеи и бронхов в растворе 1 мкг капсаицина в течение 30 минут приводила к истощению запасов тахикининов в нервных окончаниях С-волокон и к потере ими чувствительности к капсаицину. После инактивации (блокады) С-волокон препараты трахеи и бронхов практически не изменяли величины сокращения и расслабления, вызванного стимуляцией электрическим полем нервов или мышцы.

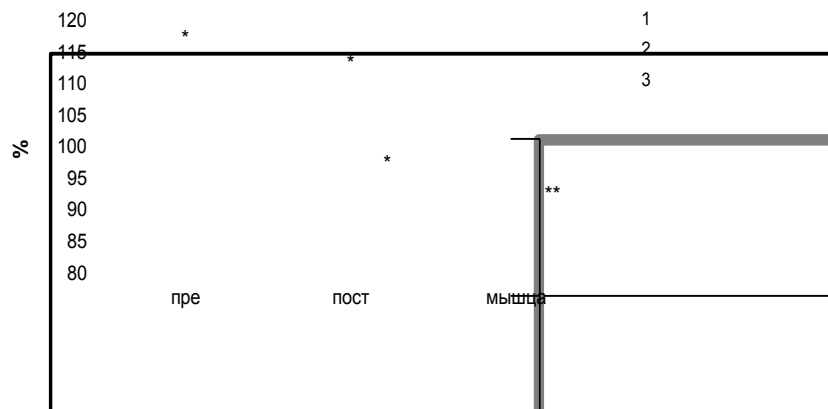


Рис. 3.7. Влияние капсаицина на сокращение бронхов

По оси абсцисс обозначены виды электрической стимуляции.

По оси ординат обозначены изменения ответов гладкой мышцы в %. За 100 % принят ответ гладкой мышцы без действия капсаицина.

«1» – контроль; «2» – первая фаза; «3» – вторая фаза действия капсаицина

«пре.» – стимуляция преганглионарных нервов

«пост» – стимуляция постганглионарных нервов

«мышца» – стимуляция мышцы

\* и \*\* – достоверное ( $P < 0,05$  и  $P < 0,01$ , соответственно) отличие от контроля.

### 3.1.4. Активность гладкой мышцы трахеи и бронхов при влиянии аденозина на фоне блокады С-волокон капсаицином

На фоне инактивации С-волокон при стимуляции нервов аденозин вызывал двухфазное изменение сократительных ответов (рис. 3.8 и 3.9). На обоих препаратах трахеи и бронхов наибольший эффект наблюдался при стимуляции постганглионарных нервов. Так, на трахее (рис. 3.8) на  $3,14 \pm 0,79$  минуте амплитуда сокращения достигала  $110,1 \pm 3,6$  % ( $P < 0,05$ ) от ответов, полученных на фоне блокады С-волокон без аппликации аденозина. После этого величина ответов уменьшалась до  $93,6 \pm 0,9$  % ( $P < 0,05$ ).

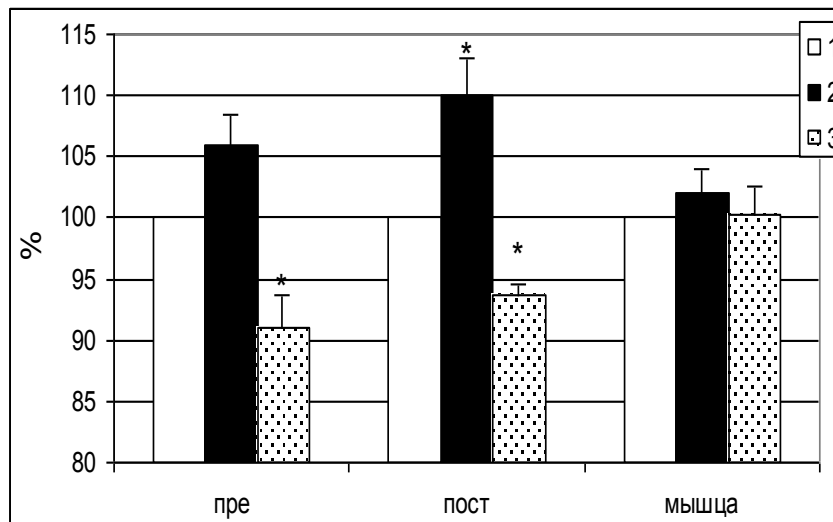


Рис. 8. Влияние аденозина на сокращения гладкой мышцы трахеи на фоне блокады С-волокон капсаицином

По оси абсцисс обозначены виды электрической стимуляции.

По оси ординат обозначены изменения ответов гладкой мышцы в %. За 100 % принят ответ гладкой мышцы без действия капсаицина.

«1» – контроль; «2» – первая фаза; «3» – вторая фаза действия капсаицина

«пре.» – стимуляция преганглионарных нервов

«пост» – стимуляция постганглионарных нервов

«мышца» – стимуляция мышцы

\* – достоверное ( $P < 0,05$ ) отличие от контроля.



При стимуляции гладкомышечных клеток аденозин не изменял амплитуды сокращения. Величина расслабления при всех видах стимуляции не изменялась под влиянием аденозина.

На препаратах бронхов влияние аденозина на фоне инактивации С-волокон во многом было аналогично влиянию на трахею (рис. 3.9). Аденозин вызывал двухфазное изменение амплитуды сокращения и максимальный эффект, достигающий  $111,7 \pm 1,2 \%$ , регистрировался на  $4,0 \pm 0,7$  минуте при стимуляции постганглионарных нервов. Этот эффект аденозина был равен эффекту, показанному при действии одного аденозина.

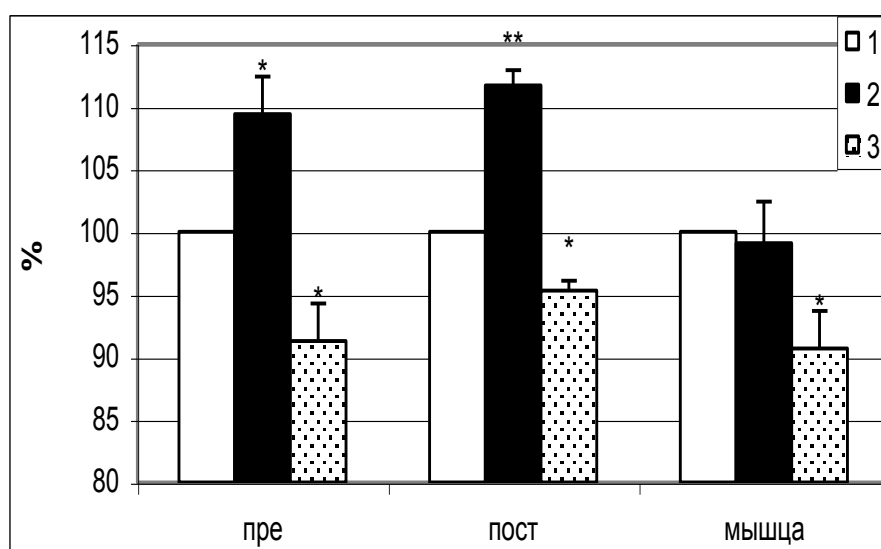


Рис. 3.9. Влияние аденозина на сокращения гладкой мышцы бронхов на фоне блокады С-волокон капсаицином

По оси абсцисс обозначены виды электрической стимуляции.

По оси ординат обозначены изменения ответов гладкой мышцы в %. За 100 % принят ответ гладкой мышцы без действия капсаицина.

«1» – контроль; «2» – первая фаза; «3» – вторая фаза действия капсаицина

«пре.» – стимуляция преганглионарных нервов

«пост» – стимуляция постганглионарных нервов

«мышца» – стимуляция мышцы

\* и \*\* – достоверное ( $P < 0,05$  и  $P < 0,01$ , соответственно) отличие от контроля.

При стимуляции мышцы, в отличие от трахеи, аденозин на фоне блокады С-волокон вызывал снижение амплитуды сокращения до  $90,7 \pm 3,0$  % ( $P < 0,05$ ), но величина этого снижения не отличалась от снижения, вызванного при применении одного аденозина.

Инактивация чувствительных нервных окончаний С-волокон капсаицином практически не влияла на эффект аденозина на амплитуду сокращения и расслабления трахеи и бронхов при стимуляции нервов, наибольший эффект также проявлялся при постганглионарной стимуляции.

### **3.1.5. Активность гладкой мышцы трахеи и бронхов при действии аденозина на фоне блокаде С-волокон и тучных клеток**

Добавление стабилизации мембраны тучных клеток к блокаде С-волокон изменяло ответы препаратов трахеи и бронхов на аденозин. На препаратах трахеи добавление кромогликата натрия отменяло ответы на аденозин при преганглионарной и мышечной стимуляции и практически не изменяло ответы, вызванные постганглионарной стимуляцией (рис. 3.10). На препаратах бронхов под влиянием аденозина на фоне блокады С-волокон и тучных клеток регистрировалось небольшое усиление сократительных ответов гладкой мышцы, вызванных постганглионарной стимуляцией, до  $115,2 \pm 1,1$  % против  $111,7 \pm 1,2$  ( $P < 0,05$ ) в опытах без кромогликата натрия. Изменение ответов, вызванных стимуляцией преганглионарных нервов или мышцы, практически отсутствовало в экспериментах со стабилизации тучных клеток.

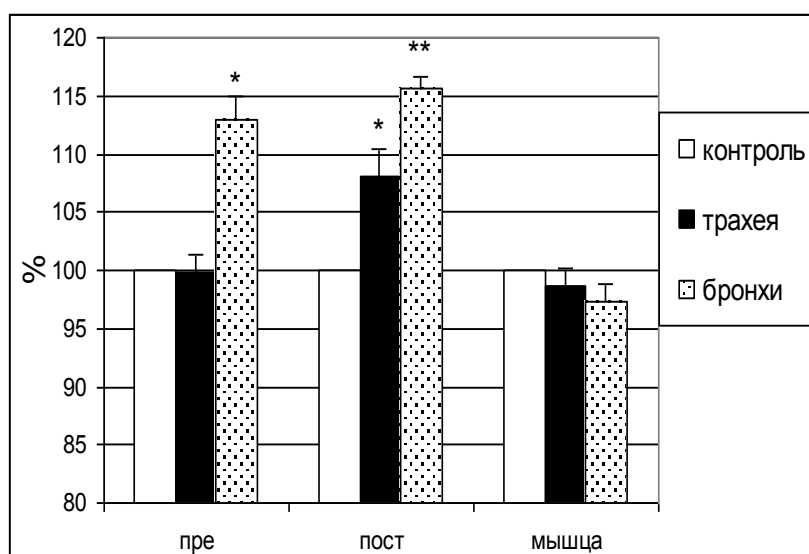


Рис. 3.10. Влияние аденозина при блокаде С-волокон и тучных клеток

По оси абсцисс обозначены виды электрической стимуляции.

По оси ординат обозначены изменения ответов гладкой мышцы в %. За 100 % принят ответ гладкой мышцы без действия аденозина.

«пре.» – стимуляция преганглионарных нервов

«пост» – стимуляция постганглионарных нервов

«мышца» – стимуляция мышцы

\* и \*\* – достоверное ( $P < 0,05$  и  $P < 0,01$ , соответственно) отличие от контроля.

Можно заключить, что аденозин и капсаицин вызывали двухфазное действие на препараты трахеи и бронхов. Первая фаза – увеличение ответов регистрировалась, главным образом, при стимуляции нервов. Наибольшее усиление ответов отмечалось при стимуляции постганглионарных нервов. Вторая фаза – снижение – ответов в большинстве случаев наблюдалась при стимуляции мышцы. Различия между ответами трахеи и бронхов касались только количественной стороны: аденозин усиливал сокращение на бронхах больше, чем на трахее.

На фоне блокады чувствительных нервных окончаний С-волокон капсаицином и стабилизации тучных клеток кромогликатом натрия аденозин

также вызывал увеличение ответов трахеи и бронхов, которое по величине практически не отличалось усиления, имевшего место в опытах без добавления блокаторов. Возможно, что наблюдаемый эффект аденозина в данных условиях эксперимента был максимальным.

Учитывая, что наибольший эффект аденозина проявлялся при стимуляции электрическим полем постганглионарных нервов, а активация гладкой мышцы дыхательных путей в естественных условиях определяется выделением ацетилхолина из постганглионарных холинергических нервов, в дальнейшем при анализе механизмов действия аденозина, влияния тучных клеток, нейронов интрамуральных ганглиев и С-волокон на работу трахеи и бронхов, в экспериментах мы будем применять только стимуляцию постганглионарных нервов.

### **3.2. Роль блокады эпителия в реакции гладкой мышцы**

Эпителиальный слой клеток, выстилающий внутреннюю поверхность респираторного тракта, прямо подвержен воздействию соединений атмосферного воздуха, способных сенсibilизировать организм, в результате чего происходит развитие аллергической реакции. Эпителий способен оказывать влияние на сократительную активность прилегающего к нему гладкомышечного слоя за счет выделения простагландинов – ПГЕ<sub>2</sub>, ПГФ<sub>2α</sub> и других, оказывающих дилатационный или констрикторный эффект. В данной главе мы рассмотрим влияние ингибирования синтеза простагландинов при различных видах воздействия на гладкие мышцы трахеи и бронхов: стимуляции электрическим полем постганглионарных нервов, аппликации аденозина и аппликации капсаицина. Роль нейронов интрамуральных ганглиев в этом процессе мы будем оценивать сравнением эффекта ингибирования синтеза простагландинов на препаратах трахеи и бронхов содержащих ганглии и без них.

### 3.2.1. Активность гладкой мышцы трахеи и бронхов, вызванная стимуляцией постганглионарных нервов, при ингибировании синтеза простагландинов

На фоне физиологического раствора неспецифический ингибитор синтеза простагландинов индометацин вызывал снижение сократительных ответов гладкой мышцы трахеи с ганглиями, вызванных стимуляцией постганглионарных нервов до  $78,7 \pm 2,6$  % на  $7,0 \pm 0,1$  минуте (рис. 3.11).

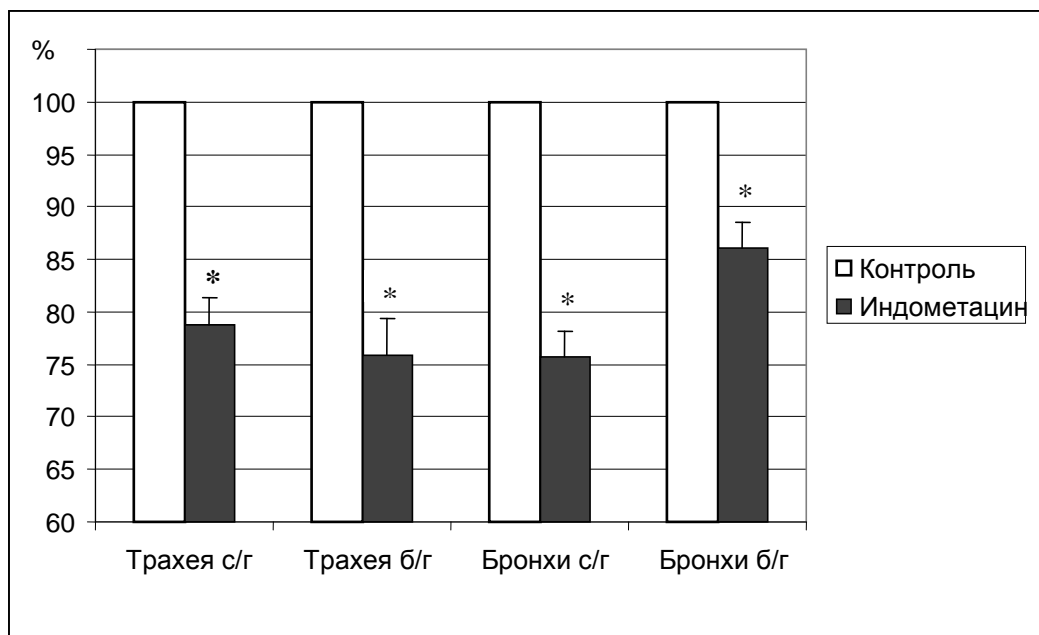


Рис. 3.11. Сокращения ГМ трахеи и бронхов при постганглионарной стимуляции и при блокаде эпителия индометацином

По оси абсцисс обозначены препараты

По оси ординат обозначены изменения ответов гладкой мышцы в %. За 100 % приняты ответы гладкой мышцы, вызванные стимуляцией постганглионарных нервов, на фоне физиологического раствора

«Трахея с/г.» – трахея с ганглиями

«Трахея б/г» – трахея без ганглиев

«Бронхи с/г.» – бронхи с ганглиями

«Бронхи б/г.» – бронхи без ганглиев

\* – достоверное ( $P < 0,05$ ) отличие от контроля

На трахее без ганглиев снижение ответов достигало практически той же величины –  $75,8 \pm 3,6$  %, однако оно происходило на  $5,71 \pm 0,82$  минуте ( $P < 0,05$ ), то есть значительно раньше. На препаратах бронхов с ганглиями и без ганглиев снижение величины сокращения, вызываемое обработкой препаратов индометацином достоверно не различалось ( $75,7 \pm 2,4$  % и  $79,5 \pm 2,8$  % на бронхах с ганглиями и без ганглиев, соответственно), однако в первом случае уменьшение амплитуды сокращения наступало на  $6,4 \pm 0,49$  минуте, а во втором – на  $5,0 \pm 0,84$  минуте ( $P < 0,05$ ). Латентный период ответа у всех препаратов под влиянием индометацина не изменялся.

Величина расслабления препаратов трахеи и бронхов с ганглиями и без ганглиев после ингибирования синтеза простагландинов индометацином достоверно не отличалась от контроля.

### **3.2.2. Активность ГМ трахеи и бронхов при действии аденозина и ингибировании синтеза простагландинов**

На фоне ингибирования синтеза простагландинов аденозин оказывал двухфазный эффект при сокращения гладкой мышцы, вызванный стимуляцией постганглионарных нервов (рис. 3.12). Первая фаза у всех препаратов характеризовалась незначительным усилением сокращения гладкой мышцы до  $103,7 - 105,8$  % ( $P < 0,05$ ). На препаратах трахеи с ганглиями фаза усиления сокращения наступала на  $2,50 \pm 0,39$  минуте, на бронхах с ганглиями – на  $1,82 \pm 0,36$ . На препаратах без ганглия первая фаза наступала значительно позже и равнялась  $3,5 \pm 0,27$  мин у трахеи и  $4,5 \pm 0,32$  мин у бронхов.

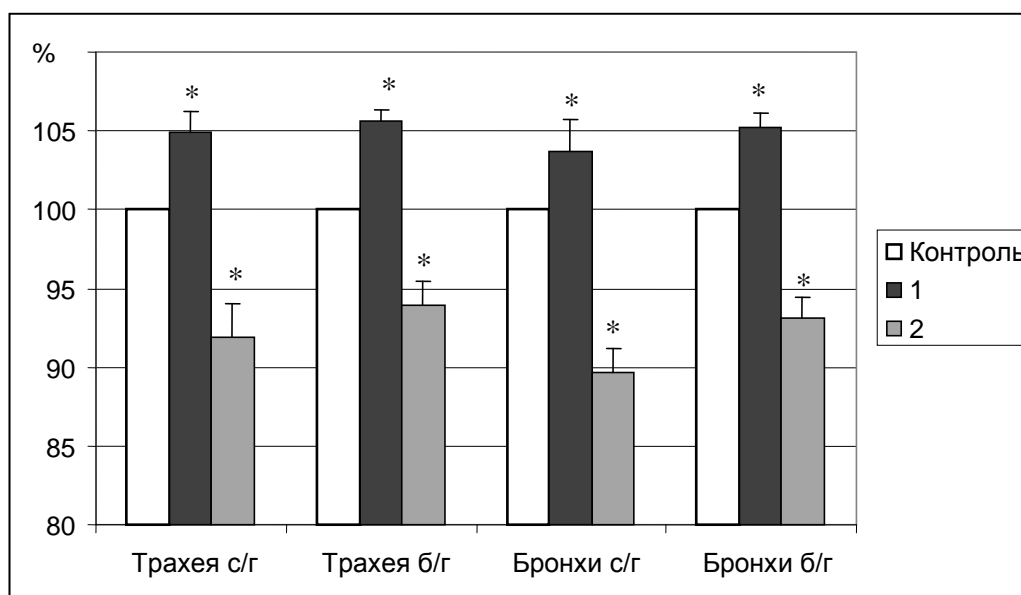


Рис. 3.12. Действие аденозина на фоне блокады эпителия индометацином

По оси абсцисс обозначены препараты. По оси ординат обозначены изменения ответов гладкой мышцы в %. За 100 % приняты ответы гладкой мышцы, вызванные стимуляцией постганглионарных нервов, на фоне блокады индометацином.

«Трахея с/г.» – трахея с ганглиями; «Трахея б/г» – трахея без ганглиев;

«Бронхи с/г.» – бронхи с ганглиями; «Бронхи б/г.» – бронхи без ганглиев

«1» – первая фаза действия аденозина, «2» – вторая фаза действия аденозина;

\* – достоверное ( $P < 0,05$ ) отличие от контроля;

Вторая фаза – снижение сокращения у всех препаратов трахеи и бронхов была примерно одинакова по величине и составляла 89,7 – 93,9 %. У препаратов с ганглиями она наступала достоверно ( $P < 0,05$ ) позже, чем первая фаза – на  $4,8 \pm 0,66$  минуте у трахеи и на  $5,75 \pm 0,51$  минуте у бронхов. На препаратах без ганглия вторая фаза хотя и наступала после первой, но достоверной разницы во времени наступления первой и второй фазы выявлено не было. На фоне ингибирования синтеза простагландинов аденозин не изменял величины расслабления у всех используемых препаратов.

### 3.2.3. Активность гладкой мышцы трахеи и бронхов при активации С–волокон и ингибировании синтеза простагландинов

На фоне ингибирования синтеза простагландинов индометацином активация С–волокон дает изменение сокращения гладкой мускулатуры трахеи и бронхов с ганглиями при стимуляции постганглионарных нервов (рис. 3.13).

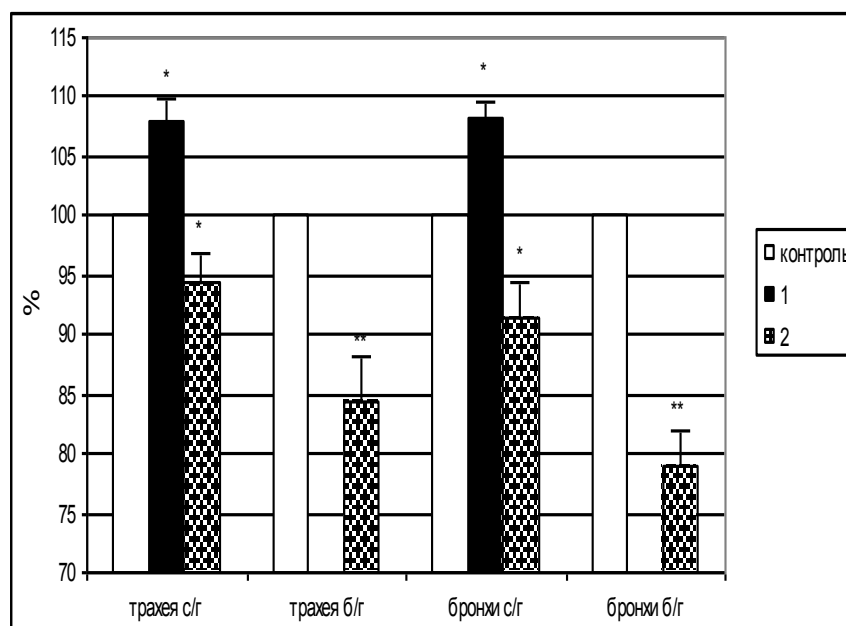


Рис. 3.13. Сократительные ответы ГМ трахеи и бронхов на фоне действия капсаицина и блокады эпителия индометацином

По оси абсцисс обозначены препараты

По оси ординат обозначены изменения ответов гладкой мышцы в %. За 100 % приняты ответы гладкой мышцы, вызванные стимуляцией постганглионарных нервов на фоне индометацина.

«Трахея с/г.» – трахея с ганглиями

«Трахея б/г» – трахея без ганглиев

«Бронхи с/г.» – бронхи с ганглиями

«Бронхи б/г.» – бронхи без ганглиев

\* и \*\* – достоверное ( $P < 0,05$  и  $P < 0,01$ , соответственно) отличие от контроля

Увеличение сократительных ответов гладкой мышцы трахеи с ганглиями 2,91 ± 0,80 минуте составляло 107,9 ± 2,0 %, а бронхов – на 3,10 ± 0,74 минуте 108,1 ± 1,6 %. Вторая фаза снижение сокращения до 91,4 ± 2,9 %



на трахее наступала на  $4,82 \pm 0,56$  минуте, на бронхах снижение сокращения до  $94,4 \pm 2,4$  % регистрировалось на  $5,20 \pm 0,63$  минуте. На трахее и бронхах без ганглиев после ингибирования синтеза простагландинов капсаицин вызывал только уменьшение сокращения, вызванного стимуляцией постганглионарных нервов до  $84,4 \pm 3,7$  % на препаратах трахеи и до  $78,9 \pm 3,0$  % на бронхах. В данных экспериментальных условиях изменения расслабления гладкой мышцы, вызванного электрической стимуляцией постганглионарных нервов, под влиянием капсаицина на фоне ингибирования эпителия по сравнению с действием одного капсаицина не наблюдалось.

Различия между средними значениями сокращения и расслабления трахеи и бронхов отсутствовали (рис. 3.13). Различия между средними значениями сокращений гладкой мускулатуры с ганглиями и бронхов без ганглиев достоверны (при  $P < 0,05$ ).

Таким образом, эпителий играл определенную роль в сократительных ответах гладкой мышцы трахеи и бронхов. Эпителий усиливал сократительные ответы гладкой мышцы, и при его блокаде эти ответы уменьшались. Вероятно, его бронхоконстрикторное действие связано с синтезом простагландинов, усиливающих сокращение гладкой мускулатуры ( $\text{PGF}_{2\alpha}$  и других).

В предыдущей главе было показано, что действие аденозина на препараты трахеи и бронхов вызывало двухфазную реакцию и усиление сократительных ответов. В данной серии экспериментов установлено, что при блокаде эпителия индометацином, констрикторный эффект аденозина достоверно ( $P < 0,05$ ) уменьшался. Достоверно уменьшались величины сокращения первой и второй фаз сокращения, что указывает на то, что блокада синтеза простагландинов влияет на действие аденозина, уменьшая ответы.

Применение блокады эпителия при активации С-волокон капсаицином не вызывало достоверных сократительных ответов, по сравнению с ответами, вызванными действием одного только капсаицина, что указывало на то, что блокада синтеза простагландинов не оказывает влияния эффект капсаицина.

### **3.3. Роль блокады гистаминовых рецепторов в реакции гладкой мышцы**

Гистаминовые H1– и H2–рецепторы являются основными акцепторами гистамина, выбрасываемого в процессе дегрануляции тучных клеток. Активированные гистамином рецепторы запускают биофизические и биохимические цепочки реакций, являющиеся причиной большего или меньшего изменения сокращения гладкой мускулатуры респираторного тракта. В данной главе все эксперименты проводились при предварительном ингибировании синтеза простагландинов индометацином.

#### **3.3.1. Активность гладкой мышцы трахеи и бронхов при стимуляции нервов и блокаде гистаминовых рецепторов**

##### ***Блокада H1 гистаминовых рецепторов***

Блокатор гистаминовых H1–рецепторов супрастин давал снижение сократительных ответов гладкой мускулатуры трахеи и бронхов, вызванных стимуляцией постганглионарных нервов (рис. 3.14). Снижение сократительных ответов гладкой мускулатуры трахеи с ганглиями составляло до  $59,7 \pm 3,5$  %, трахеи без ганглиев до  $64,1 \pm 3,5$  %. Снижение сокращения на препаратах бронхов происходило до  $64,1 \pm 1,7$  % и на препаратах без ганглиев – до  $61, \pm 3,5$  %.

Аппликация в ванночку с препаратами достоверно ( $P < 0,05$ ) увеличивала величину расслабления трахеи с ганглиями с  $11,9 \pm 1,9$  мг до

16,8 ± 2,5 мг и бронхов с ганглиями с 15,5 ± 1,2 мг до 20 ± 2,5 мг (рис. 3.15). На препаратах трахеи и бронхов без ганглиев достоверного изменения амплитуды расслабления при действии блокатора H1–рецепторов не наблюдалось.

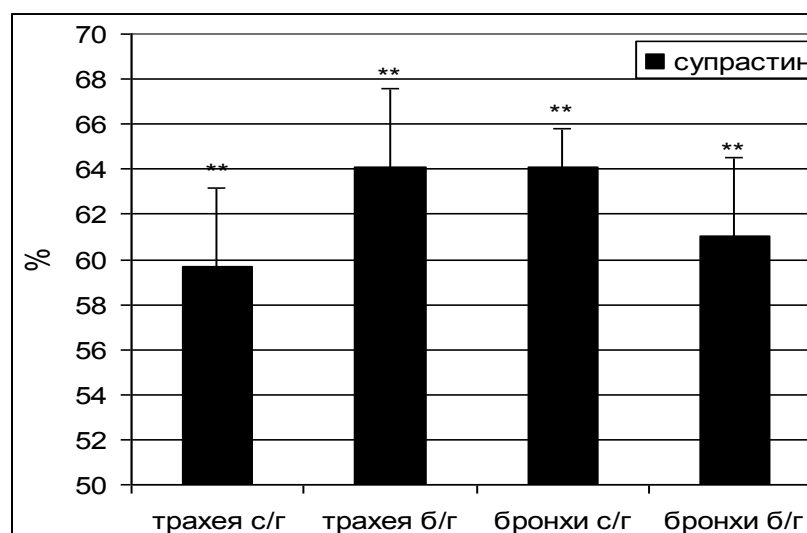


Рис. 3.14. Влияние блокады гистаминовых H1 рецепторов супрастином на сократительные ответы гладкой мускулатуры трахеи и бронхов при постганглионарной стимуляции на фоне блокады эпителия

По оси абсцисс обозначены препараты

По оси ординат обозначены изменения ответов гладкой мышцы в %. За 100 % приняты ответы гладкой мышцы, вызванные стимуляцией постганглионарных нервов на фоне индометацина

«Трахея с/г.» – трахея с ганглиями

«Трахея б/г» – трахея без ганглиев

«Бронхи с/г.» – бронхи с ганглиями

«Бронхи б/г.» – бронхи без ганглиев

\* и \*\* – достоверное ( $P < 0,05$  и  $P < 0,01$ ) отличие от контроля

### ***Блокада H2 гистаминовых рецепторов***

Блокатор гистаминовых H2–рецепторов циметидин на фоне блокады эпителия достоверно ( $P < 0,05$ ) повышал сократительные ответы гладкой мышцы трахеи с ганглиями до  $106,2 \pm 2,1$  % и бронхов с ганглиями до  $107,3$

$\pm 1,8 \%$  при постганглионарной стимуляции (рис. 3.16). На препаратах без ганглиев на фоне блокады эпителия циметидин достоверно не изменял сократительных ответов гладкой мускулатуры трахеи и бронхов.

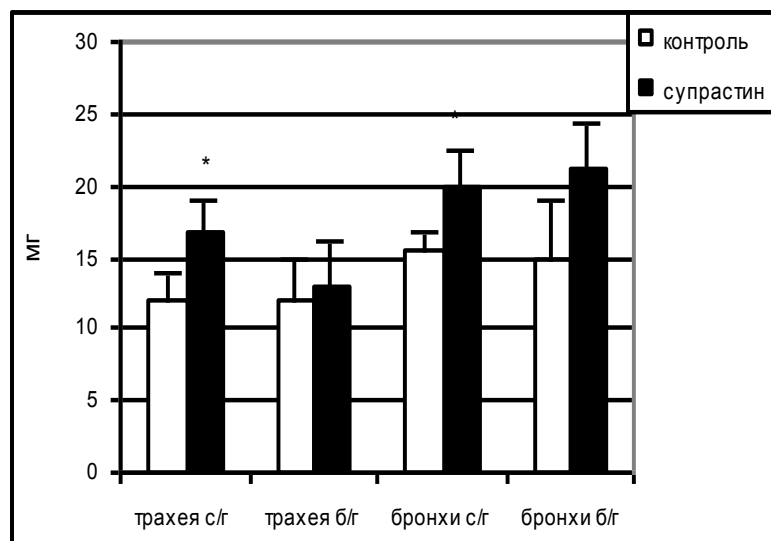


Рис. 3.15. Расслабление гладкой мускулатуры трахеи и бронхов при постганглионарной стимуляции на фоне блокады эпителия индометацином и N1 рецепторов супрастином

По оси абсцисс обозначены препараты

По оси ординат обозначены изменения ответов гладкой мышцы в %. За 100 % приняты ответы гладкой мышцы, вызванные стимуляцией постганглионарных нервов на фоне индометацина

«Трахея с/г.» – трахея с ганглиями

«Трахея б/г» – трахея без ганглиев

«Бронхи с/г.» – бронхи с ганглиями

«Бронхи б/г.» – бронхи без ганглиев

\* – достоверное ( $P < 0,05$  и  $P < 0,01$ ) отличие от контроля

Блокада гистаминовых H<sub>2</sub>-рецепторов практически не сказывалась на величине расслабления гладкой мышцы, вызванного стимуляцией постганглионарных нервов, у всех используемых препаратов.

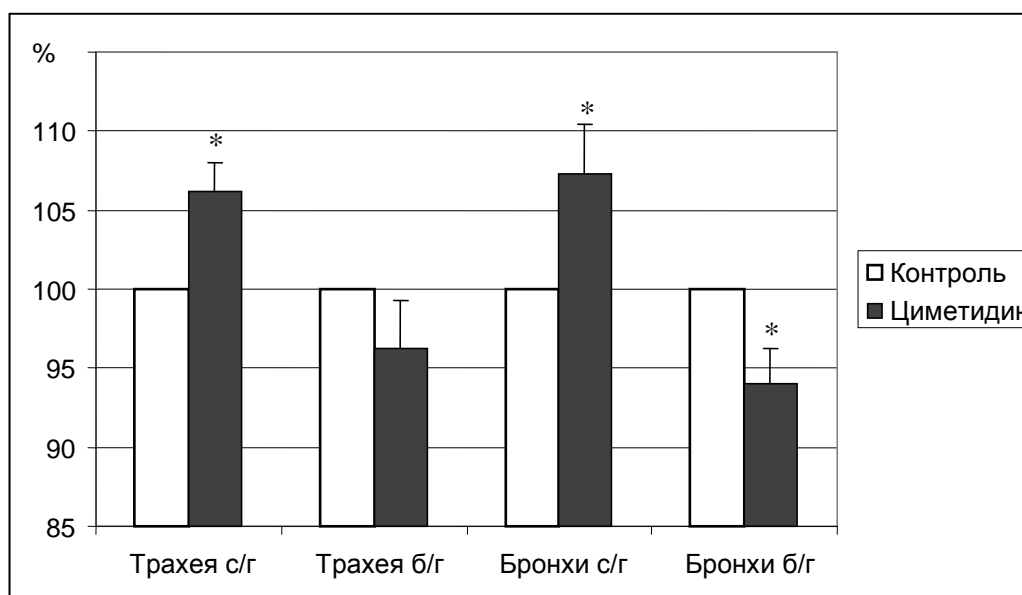


Рис. 3.16 Влияние блокады гистаминовых H<sub>2</sub> рецепторов циметидином на сократительные ответы гладкой мускулатуры трахеи и бронхов при постганглионарной стимуляции.

По оси абсцисс обозначены препараты

По оси ординат обозначены изменения ответов гладкой мышцы в %

За 100 % приняты ответы гладкой мышцы, вызванные стимуляцией постганглионарных нервов на фоне индометацина

«Трахея с/г.» – трахея с ганглиями

«Трахея б/г» – трахея без ганглиев

«Бронхи с/г.» – бронхи с ганглиями

«Бронхи б/г.» – бронхи без ганглиев

\* – достоверное ( $P < 0,05$ ) отличие от контроля

### 3.3.2. Активность гладкой мышцы трахеи и бронхов при действии аденозина и блокаде гистаминовых рецепторов

#### *Блокада H<sub>2</sub>-рецепторов*

При блокаде H<sub>2</sub>-рецепторов циметидином на фоне постганглионарной стимуляции с применением блокады эпителия аденозин оказывал двухфазный эффект: сначала наблюдалось увеличение сократительных ответов гладкой мышцы, а затем – уменьшение (рис. 3.17). Ответы трахеи с

ганглиями на  $3,00 \pm 0,91$  минуте повышались до  $108,9 \pm 1,4$  %, что было достоверно ( $P < 0,05$ ) выше действия одного аденозина ( $98,8 \pm 3,2$  %). Фаза снижения сокращения на трахее с ганглиями при действии аденозина на фоне блокады эпителия практически отсутствовала ( $96 \pm 2,4$  %), в то время как при действии одного аденозина она равнялась  $85,9 \pm 3,7$  %. Ответы трахеи без ганглиев на  $2,00 \pm 0,58$  минуте повышались почти на такую же величину ( $109,5 \pm 2,6$  %) и превышали ( $P < 0,05$ ) эффект одного аденозина ( $105,4 \pm 0,7$  %). Фаза снижения сокращения на этих препаратах равнялась  $92,9 \pm 3,1$  % и регистрировалась на  $6,00 \pm 0,58$  минуте. В экспериментах без блокады H<sub>2</sub>-рецепторов величина снижения сокращения почти не отличалась ( $89,6 \pm 1,4$  %), но наблюдалась она на  $3,5 \pm 0,64$  минуте.

При действии аденозина на фоне блокады H<sub>2</sub>-рецепторов бронхи с ганглиями и без ганглиев показывали усиление сократительных ответов ( $116,1 \pm 4,9$  и  $116,3 \pm 5,2$  %, соответственно), которое было больше по величине, чем на трахее (рис. 3.17). Время максимального ответа у этих препаратов было так же одинаково ( $2,00 \pm 0,58$  минуты). Фаза снижения сокращения на бронхах отсутствовала ( $94,9 \pm 2,8$  % и  $97,4 \pm 4,6$  % для бронхов с ганглиями и без ганглиев, соответственно), хотя при действии аденозина на препараты, не обработанные циметидином снижение сокращений имело место.

На препаратах трахеи с ганглиями и без ганглиев аденозин на фоне блокады гистаминовых H<sub>2</sub>-рецепторов достоверно не изменял величины расслабления при стимуляции постганглионарных нервов. На бронхах с ганглиями амплитуда расслабления уменьшалась с  $20,2 \pm 5,3$  мг (в экспериментах без блокады H<sub>2</sub>-рецепторов) до  $10,5 \pm 2,3$  мг ( $P < 0,05$ ) и с  $17,5 \pm 3,7$  мг до  $9,5 \pm 2,3$  мг ( $P < 0,05$ ).

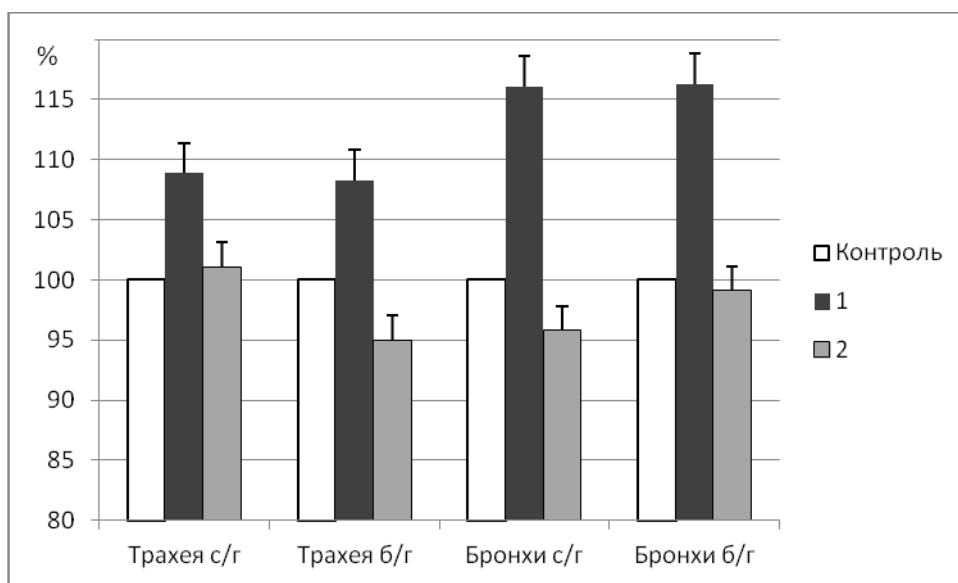


Рис. 3.17. Влияние блокады гистаминовых H<sub>2</sub> рецепторов циметидином на сократительные ответы гладкой мускулатуры трахеи и бронхов, обработанных аденозином при постганглионарной стимуляции.

По оси абсцисс обозначены используемые препараты.

По оси ординат обозначены изменения ответов гладкой мышцы в %. За 100 % приняты ответы гладкой мышцы, полученные при стимуляции постганглионарных нервов на фоне действия аденозина.

«Трахея с/г.» – трахея с ганглиями

«Трахея б/г» – трахея без ганглиев

«Бронхи с/г.» – бронхи с ганглиями

«Бронхи б/г.» – бронхи без ганглиев

«1» – первая фаза действия аденозина на фоне блокады H<sub>2</sub> рецепторов циметидином

«2» – вторая фаза действия аденозина на фоне блокады H<sub>2</sub> рецепторов циметидином

\* – достоверное ( $P < 0,05$ ) отличие от контроля

### ***Блокада H<sub>1</sub>–рецепторов***

Блокада гистаминовых H<sub>1</sub>–рецепторов супрастином на фоне постганглионарной стимуляции с применением блокады H<sub>2</sub>–рецепторов уменьшала сократительные ответы гладкой мышцы всех используемых препаратов на применение аденозина (рис. 3.18). Ответы трахеи с ганглиями на  $6,00 \pm 0,53$  минуте снижались до  $42,9 \pm 1,9$  %, что было достоверно ( $P < 0,01$ ) ниже, чем при действии одного аденозина ( $85,9 \pm 3,7$  %). Ответы трахеи

без ганглиев на  $7,00 \pm 0,10$  минуте снижались почти на такую же величину ( $42,1 \pm 5,2$  %), и так же превышали ( $P < 0,05$ ) действия одного аденозина ( $109,5 \pm 2,6$  %).

Действие аденозина при блокаде  $H_1$ -рецепторов на бронхи с ганглиями оказывало такой же эффект на сократительные ответы ( $39,5 \pm 3,4$ ). Время ответа наступало на  $7,0 \pm 0,1$  минуте. На бронхах без ганглиев снижение сокращения достигала  $50,3 \pm 2,8$  % на  $5,50 \pm 0,36$  минуте.

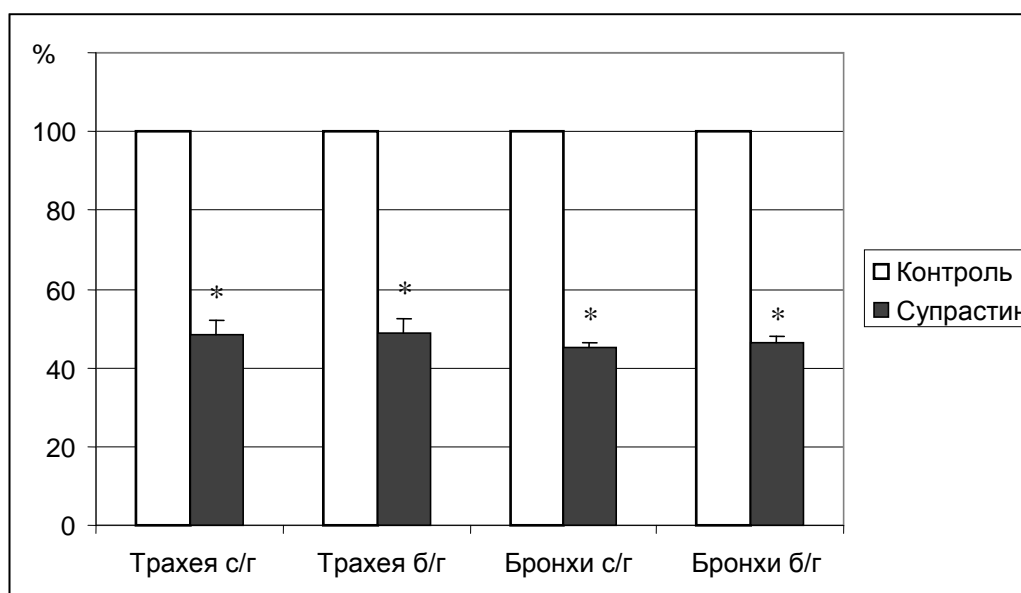


Рис. 3.18. Влияние блокады  $H_1$ -рецепторов супрастином на сократительные ответы ГМ трахеи и бронхов, вызванные постганглионарной стимуляцией, на фоне блокады  $H_2$  рецепторов циметидином при аппликации аденозина

По оси абсцисс обозначены используемые препараты

По оси ординат обозначены изменения ответов гладкой мышцы в %. За 100 % приняты ответы гладкой мышцы, полученные при постганглионарной стимуляции на фоне индометацина, циметидина и аппликаций аденозина.

«Трахея с/г.» – трахея с ганглиями

«Трахея б/г» – трахея без ганглиев

«Бронхи с/г.» – бронхи с ганглиями

«Бронхи б/г.» – бронхи без ганглиев

\* – достоверное ( $P < 0,05$ ) отличие от контроля



На препаратах трахеи с ганглиями и без ганглиев аденозин на фоне блокады гистаминовых H<sub>2</sub>-рецепторов достоверно не изменял величины расслабления при стимуляции постганглионарных нервов.

Таким образом, блокада H<sub>1</sub>-рецепторов достоверно уменьшает эффект аденозина на гладкую мышцу трахеи и бронхов (P<0,01 для снижения амплитуды сокращения и P<0,05 для времени наступления снижения).

### **3.3.3. Активность гладкой мышцы трахеи и бронхов при активации C-волокон и блокаде гистаминовых рецепторов**

#### *Активность гладкой мышцы трахеи и бронхов при активации C-волокон и блокаде H<sub>2</sub>-рецепторов*

При блокаде H<sub>2</sub>-рецепторов циметидином при постганглионарной стимуляции аппликация в ванночку 1 мкг капсаицина оказывала двухфазный эффект: сначала наблюдалось увеличение сократительных ответов гладкой мышцы, сменяемое их уменьшением (рис. 3.19). Ответы трахеи с ганглиями на 2.29 ± 0,82 минуте повышались до 108,6 ± 2,8 % (P < 0,05). Фаза снижения сокращения на трахее с ганглиями при действии капсаицина на фоне блокады H<sub>2</sub>-рецепторов на 4,43 ± 0,72 минуте составляла 90,5 ± 1,8 % (P<0,05). Ответы трахеи без ганглиев на 1,5 ± 0,46 минуте повышались почти на такую же величину (1079,5 ± 2,0 %; P < 0,05). Фаза снижения сокращения на этих препаратах равнялась 84,7 ± 2,0 % и регистрировалась на 7,0 ± 0,1 минуте.

Ответы препаратов бронхов при блокаде H<sub>2</sub>-рецепторов и активации стимуляцией постганглионарных нервов и капсаицином были аналогичны ответам трахеи: 107,2 ± 1,0 % на 1,0 ± 0,1 минуте для бронхов с ганглиями и 107,9 ± 1,0 % на 1,0 ± 0,1 минуте для бронхов без ганглиев. Средняя величина снижения сокращения у бронхов с ганглиями регистрировалась на 6,1 ± 0,51

минуте и составляла  $83,5 \pm 5,1$  %, у бронхов без ганглиев – на  $6,5 \pm 0,27$  минуте –  $88,8 \pm 1,3$  %.

В данных экспериментальных условиях амплитуда расслабления всех изучаемых препаратов под влиянием 1 мкг капсаицина достоверно не отличалась от контроля.

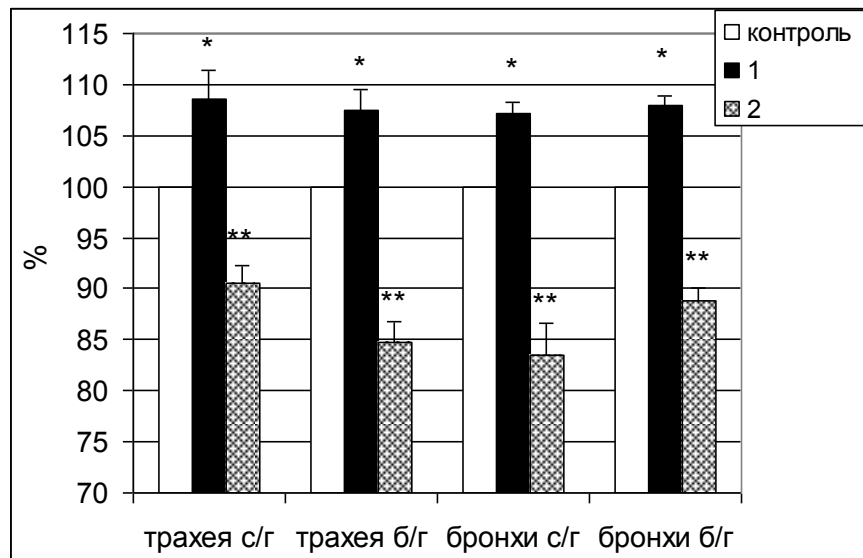


Рис. 3.19 Влияние блокады  $H_2$ -рецепторов на сократительные ответы гладкой мышцы трахеи и бронхов, вызванные стимуляцией постганглионарных нервов и активацией С-волокон

По оси абсцисс обозначены используемые препараты

По оси ординат обозначены изменения ответов гладкой мышцы в %. За 100 % приняты ответы гладкой мышцы, полученные при постганглионарной стимуляции на фоне индометацина, циметидина и аппликации 1 мкг капсаицина.

«Трахея с/г.» – трахея с ганглиями

«Трахея б/г.» – трахея без ганглиев

«Бронхи с/г.» – бронхи с ганглиями

«Бронхи б/г.» – бронхи без ганглиев

\* и \*\* – достоверное ( $P < 0,05$  и  $P < 0,01$ , соответственно) отличие от контроля.

**Активность гладкой мышцы трахеи и бронхов при активации С-волокон и блокаде Н1-рецепторов**

На фоне блокады эпителия индометацином и активации С-волокон капсаицином, блокада Н1 рецепторов супрастином оказывала достоверный ( $P < 0,01$ ) дилатационный эффект на препараты трахеи и бронхов (рис 3.20).

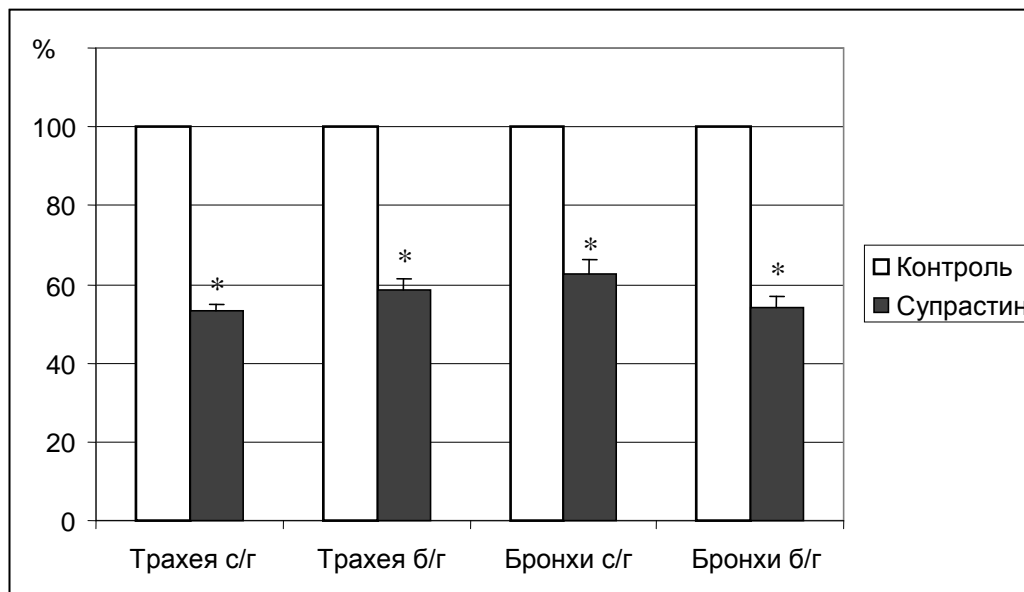


Рис. 3.20. Влияние блокады Н1-рецепторов на сократительные ответы гладкой мышцы трахеи и бронхов, вызванные стимуляцией постганглионарных нервов и активацией С-волокон

По оси абсцисс обозначены используемые препараты

По оси ординат обозначены изменения ответов гладкой мышцы в %. За 100 % приняты ответы гладкой мышцы, полученные при постганглионарной стимуляции на фоне индометацина, циметидина и аппликации 1 мкг капсаицина.

«Трахея с/г.» – трахея с ганглиями

«Трахея б/г» – трахея без ганглиев

«Бронхи с/г.» – бронхи с ганглиями

«Бронхи б/г.» – бронхи без ганглиев

\*\* – достоверное ( $P < 0,01$ , соответственно) отличие от контроля.

При постганглионарной стимуляции активация С-волокон 1 мкг капсаицина блокада Н1-рецепторов супрастином вызывала достоверное

( $P < 0,05$ ) снижение сократительных ответов трахеи с ганглиями до  $53,3 \pm 1,5$  %, трахеи без ганглиев до  $58,6 \pm 3,0$  %, бронхов с ганглиями до  $62,8 \pm 3,5$  % и бронхов без ганглиев до  $54,2 \pm 2,6$  %. Колебания в величине ответов разных препаратов было незначительным.

Амплитуда расслабления у всех препаратов на фоне блокады H1-рецепторов и активации капсаицином не отличалась от контроля.

Таким образом, можно сделать следующие заключения о роли H1 и H2-рецепторов. Блокада H1-рецепторов супрастином на фоне блокады эпителия индометацином приводила к снижению сократительных ответов трахеи и бронхов. Блокада H2-рецепторов циметидином приводила к увеличению сокращения трахеи с ганглиями и бронхов с ганглиями. Препараты без ганглиев проявляли незначительное понижение сократительных ответов, что может свидетельствовать о том, что H2-рецепторы дилатационного действия находятся только в составе нервных ганглиев.

При влиянии блокады H2-рецепторов на фоне действия аденозина и индометацина сначала во всех препаратах наблюдалось увеличение сократительных ответов, сменяющееся их понижением, что, вероятно связано с H3-рецепторами и H1-рецепторами.

Блокада H1-рецепторов на фоне действия аденозина и индометацина вызывала однофазный дилатационный ответ. При сравнении аналогичного опыта но без блокады H1-рецепторов, наблюдалась двухфазная реакция – увеличение и снижение сокращений.

Блокада H2-рецепторов на фоне активации C-волокон капсаицином и блокаде эпителия индометацином давала двухфазный ответ – увеличение сокращения сменялось его уменьшением. Такой же результат наблюдался при аналогичном опыте но без блокады H2-рецепторов. Различие между

опытами было только в ответах трахеи и бронхов без ганглиев, ответы препаратов ганглиями были аналогичны.

Блокада N1-рецепторов на фоне активации С-волокон капсаицином и блокаде эпителия индометацином вызывала однократное понижение сократительных ответов.

### **3.4. Роль блокады С-волокон, тучных клеток и нервно-мышечной передачи в реакции гладкой мышцы**

Чувствительные нервные окончания С-волокон, тучные клетки и нейроны интрамуральных ганглиев являются важнейшими участниками развития бронхоконстрикции и центральными участниками патогенеза обструктивных патологий нижних дыхательных путей. Взаимодействие этих структур является основой нейро-иммунных отношений в системе нижних дыхательных путей. В дальнейших экспериментах, используя последовательное отключение каждого звена нейро-иммунного взаимодействия, постараемся определить их роль в реакции гладкой мышцы.

#### **3.4.1. Активность гладкой мышцы трахеи и бронхов при блокаде С-волокон**

Инактивация чувствительных нервных окончаний С-волокон длительной (30 мин) обработкой 1 мкг/мл капсаицина не изменяла ответов трахеи и бронхов, вызванных стимуляцией постганглионарных нервов, но увеличивала амплитуду расслабления препаратов бронхов с  $10,6 \pm 1,4$  мг до  $19,7 \pm 3,7$  мг ( $P < 0,05$ ). При блокаде С-волокон аппликация 10 мкг аденозина на  $4,5 \pm 1,1$  минуте усиливали сокращения трахеи до  $110,4 \pm 2,4$  %, а препаратов бронхов на  $5,29 \pm 0,56$  минуте – до  $112,1 \pm 1,1$  % (рис. 3.21). То есть различий в реакциях между трахеей и бронхами после длительной обработки капсаицином и на аппликацию аденозина не наблюдалось. На

бронхах в этих экспериментах величина расслабления не изменялась, а на трахее аденозин усиливал расслабление с  $6,7 \pm 1,9$  мг до  $10,1 \pm 2,1$  мг ( $P < 0,05$ ).

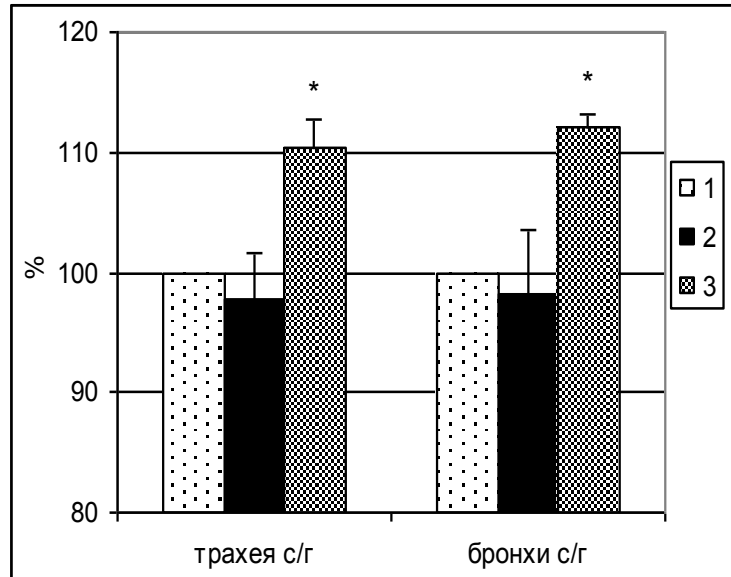


Рис. 3.21 Сократительные ответы гладкой мускулатуры трахеи и бронхов на фоне блокады С-волокон капсаицином.

По оси абсцисс обозначены препараты: «трахея с/г.» - трахея с ганглиями, «бронхи с/г.» - бронхи с ганглиями.

По оси ординат обозначены изменения ответов гладкой мышцы в %. За 100 % приняты ответы гладкой мышцы, полученные при постганглионарной стимуляции в физиологическом растворе.

1 – контроль; 2 – блокада С-волокон; 3 – влияние 10 мкг аденозина.

\* - достоверное ( $P < 0,05$ ) отличие от препаратов, не обработанных аденозином.

***Активность гладкой мышцы трахеи и бронхов при активации тучных клеток на фоне блокаде С-волокон и блокады H<sub>2</sub>-гистаминовых рецепторов***

После перфузии через ванночку с препаратами 10 мкг/мл индометацина (ингибитора синтеза простагландинов) и блокатора H<sub>2</sub>-гистаминовых рецепторов 10 мкг/мл циметидина 10 мкг аденозина снижали

амплитуду сокращения у препаратов с инактивированными С-волоконками: у трахеи до  $85,6 \pm 1,9$  %, у бронхов эффект не проявлялся ( $97,9 \pm 3,5\%$ ) (рис. 3.22). В тех же условиях препараты трахеи и бронхов без ганглиев снижали амплитуду сокращения до 78%. То есть наличие ганглиев уменьшает эффект аденозина. Величина расслабления между препаратами достоверно не отличалась.

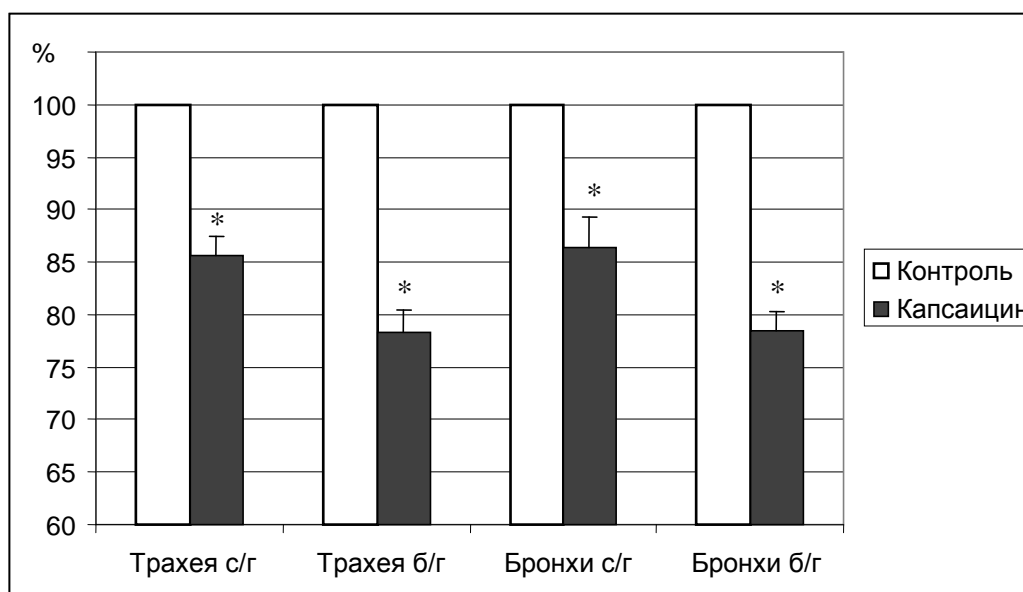


Рис. 3.22. Сократительные ответы гладкой мускулатуры трахеи и бронхов при активации тучных клеток аденозином на фоне блокады С-волокон капсаицином, эпителия и H<sub>2</sub>-рецепторов.

По оси абсцисс обозначены препараты

По оси ординат обозначены изменения ответов гладкой мышцы в %. За 100 % приняты ответы гладкой мышцы, полученные при постганглионарной стимуляции на фоне блокады эпителия индометацином, H<sub>2</sub> рецепторов циметидином и активации тучных клеток аденозином

«Трахея с/г.» - трахея с ганглиями

«Трахея б/г.» - трахея без ганглиев

«Бронхи с/г.» - бронхи с ганглиями

«Бронхи б/г.» - бронхи без ганглиев

\* - достоверное ( $P < 0,05$ ) отличие от контроля

***Активность гладкой мышцы трахеи и бронхов при блокаде С-волокон на фоне активации тучных клеток, блокады H<sub>2</sub>-гистаминовых рецепторов и новокаиновой блокаде рецепторов***

Быстро- и медленно-адаптирующиеся стреч-рецепторы, подходящие к эпителию, способны воспринимать раздражения от эпителиального слоя и, как следствие, реализовывать рефлекторные цепочки, замыкающиеся на центральном и периферическом уровнях, способных привести к развитию реакции сокращения гладкой мускулатуры. Чувствительные к капсаицину С-волокна также локализованы вблизи эпителиальных клеток. Возможные влияния эпителия на С-волокна вызывает их возбуждение, способное привести к развитию сокращения гладкой мускулатуры. С-волокна тесно сопряжены с парасимпатическими вагальными волокнами, что приводит к возбуждению парасимпатического звена, ответственного за развитие констрикторного эффекта.

На препаратах, у которых заблокированы С-волокна. эпителий и H<sub>2</sub>-гистаминовые рецепторы и которые активируются стимуляцией постганглионарных нервов и аденозином, блокада трахео-бронхиальных рецепторов новокаином совсем незначительно уменьшала сократительные ответы гладкой мускулатуры трахеи и бронхов с ганглиями (рис. 3.23). Ответы трахеи изменялись от  $85,6 \pm 1,9$  % до  $84,1 \pm 1,7$  %, а бронхов – от  $86,4 \pm 2,9$  % до  $79,0 \pm 1,3$  %. В то же время величина сокращений препаратов трахеи и бронхов без ганглиев достоверно увеличивалась до  $99,4 \pm 2,0$  и  $96,7 \pm 4,0$  %, соответственно. Можно предположить, что рецепторы в препаратах без ганглиев активируются аденозином и их возбуждение передается на гладкую мышцу рефлекторным путем через нейроны интрамуральных ганглиев.



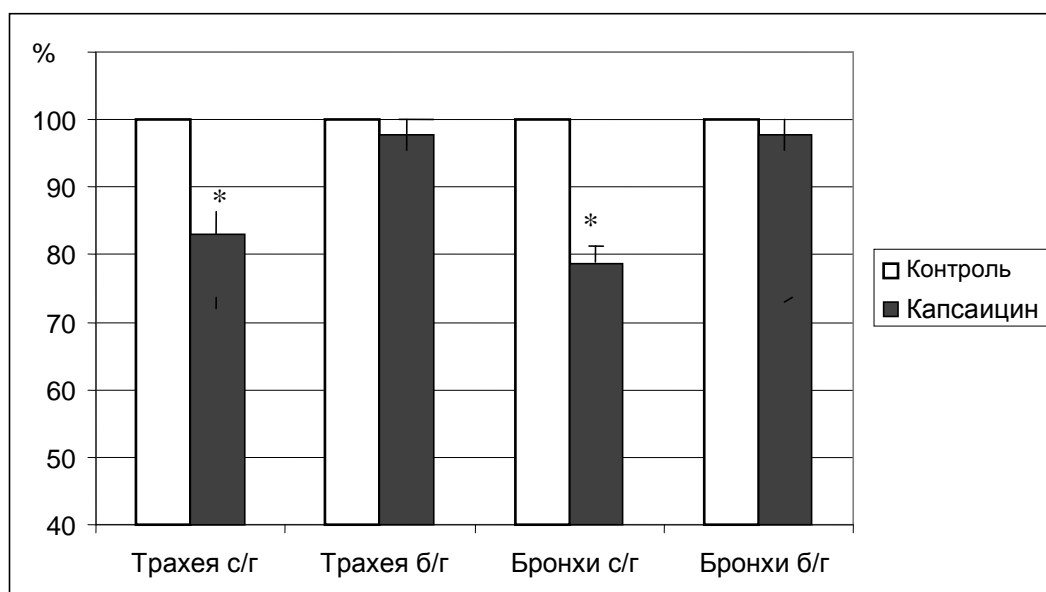


Рис. 3.23 Сократительные ответы гладкой мускулатуры трахеи и бронхов при постганглионарной стимуляции при блокаде С-волокон капсаицином на фоне активации тучных клеток аденозином, блокады эпителия индометацином, H<sub>2</sub>-гистаминовых рецепторов циметидином и новокаиновой блокаде рецепторов

По оси абсцисс обозначены используемые препараты.

По оси ординат обозначены изменения ответов гладкой мышцы в %. За 100 % приняты ответы гладкой мышцы, полученные при постганглионарной стимуляции на фоне активации тучных клеток аденозином, блокады эпителия индометацином, H<sub>2</sub>-гистаминовых рецепторов циметидином.

«Трахея с/г.» - трахея с ганглиями

«Трахея б/г.» - трахея без ганглиев

«Бронхи с/г.» - бронхи с ганглиями

«Бронхи б/г.» - бронхи без ганглиев

\* - достоверное ( $P < 0,05$ ) отличие от контроля

### 3.4.2. Активность гладкой мышцы трахеи и бронхов при стабилизации мембран тучных клеток

Обработка препаратов трахеи и бронхов кромогликатом натрия приводит к стабилизации тучных клеток, снижению их дегрануляции и, соответственно, к блокированию выделения медиаторов. Активация С-

волокон капсаицином на фоне блокады тучных клеток, эпителия и H<sub>2</sub>-рецепторов приводила к достоверному ( $P < 0,05$ ) увеличению сократительных ответов гладкой мышцы трахеи с ганглиями, вызванных стимуляцией постганглионарных нервов, до  $120,6 \pm 3,0$  % ( $P < 0,01$ ) по сравнению с экспериментами без добавления кромогликата натрия (рис. 3.24).

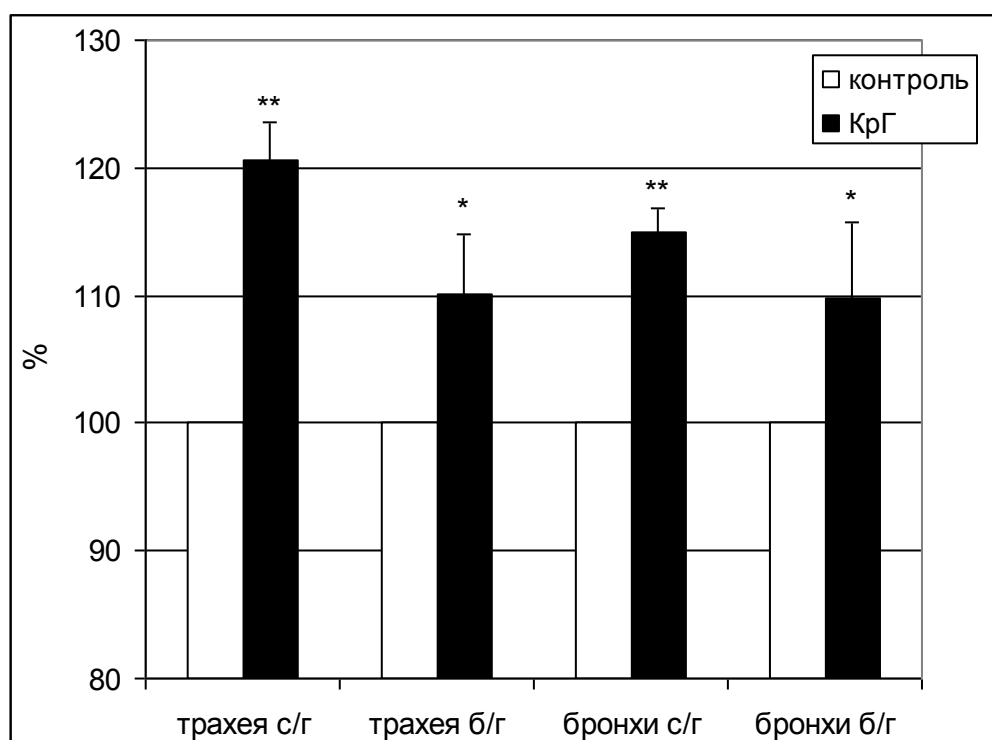


Рис. 3.24 Сократительные ответы гладкой мускулатуры трахеи и бронхов при постганглионарной стимуляции при блокаде тучных клеток кромогликатом натрия, на фоне блокады H<sub>2</sub>-рецепторов циметидином и активации С-волокон капсаицином

По оси абсцисс обозначены используемые препараты.

По оси ординат обозначены изменения ответов гладкой мышцы в %. За 100 % приняты ответы гладкой мышцы, полученные при постганглионарной стимуляции на фоне блокады H<sub>2</sub>-рецепторов и активации С-волокон капсаицином

«Трахея с/г.» - трахея с ганглиями

«Трахея б/г» - трахея без ганглиев

«Бронхи с/г.» - бронхи с ганглиями

«Бронхи б/г.» - бронхи без ганглиев

\* и \*\* - достоверное ( $P < 0,05$  и  $P < 0,01$ ) отличие от контроля

На бронхах с ганглиями в этих условиях величина сокращения увеличивалась до  $114,9 \pm 1,9$  %. На препаратах без ганглиев стабилизация тучных клеток приводила к несколько меньшему увеличению сокращения на аппликацию капсаицина: сокращения трахеи увеличивались до  $110,1 \pm 4,7$  % ( $P < 0,05$ ), сокращения бронхов – до  $109,8 \pm 5,9$  % ( $P < 0,01$ ).

В данных экспериментальных условиях достоверного изменения амплитуды расслабления не регистрировалось.

Таким образом, капсаицин, активируя чувствительные нервные окончания С-волокон, на препаратах трахеи и бронхов без ганглия вызывал усиление сокращений при стимуляции преганглионарных нервов, а на препаратах с ганглиями рефлекторно, через нейроны ганглиев снижал сокращения.

### **3.4.3. Активность гладкой мышцы трахеи и бронхов при блокаде нервно-мышечной передачи**

Для оценки роли нейронов интрамуральных ганглиев респираторного тракта в нервно-иммунных взаимодействиях наряду с уже примененным методом разных видов стимуляции (см. раздел 3.1.) и сравнения результатов экспериментов, проведенных на препаратах, содержащих ганглии и без ганглиев, мы использовали блокаду нервно-мышечной передачи, тем самым удаляя (или уменьшая) воздействия эфферентных холинергических нейронов.

#### ***Активность гладкой мышцы трахеи и бронхов при стимуляции постганглионарных нервов и изоляции ганглиев***

При постганглионарной стимуляции блокада нервно-мышечной передачи неспецифическим антагонистом мускариновых рецепторов атропином вызывала достоверное ( $P < 0,01$ ) снижение сократительных ответов

гладкой мускулатуры трахеи и бронхов (рис. 3.25). Ответы трахеи с ганглиями понижались до  $18,1 \pm 3,4$  % трахеи без ганглиев до  $18,5 \pm 3,3$  % бронхов с ганглиями до  $19,5 \pm 2,9$  % и бронхов без ганглиев до  $19,6 \pm 0,8$  %. Кроме того, атропин замедлял развитие сокращения и максимальный ответ регистрировался на  $7,0 \pm 0,1$  минуте, в то время как без атропина максимум сокращения приходился на  $5,2 - 5,67$  минуты. Практически атропин понижал сокращения гладкой мышцы на одну и ту же величину независимо от наличия ганглиев.

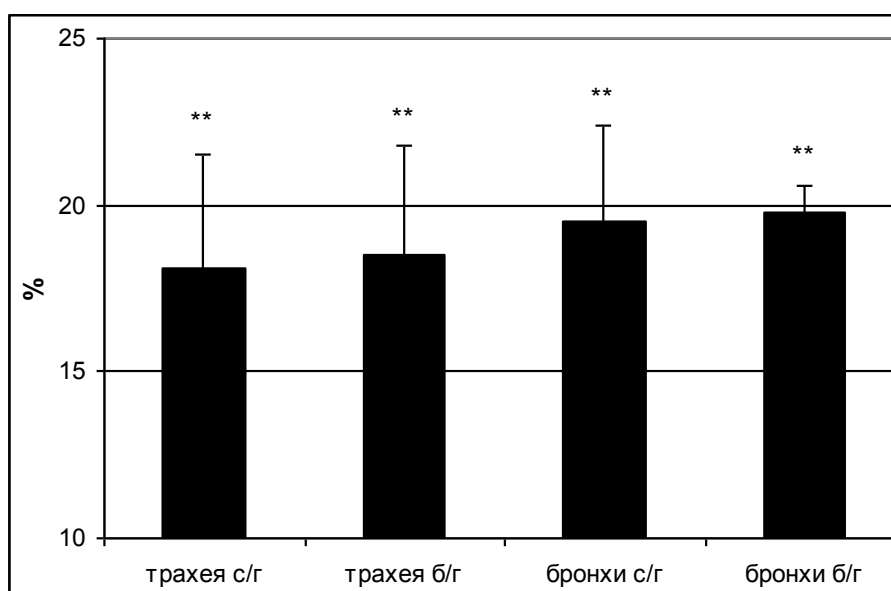


Рис. 3.25. Влияние блокады нервно-мышечной передачи атропином на сократительные ответы гладкой мускулатуры трахеи и бронхов при постганглионарной стимуляции.

По оси абсцисс обозначены используемые препараты.

По оси ординат обозначены изменения ответов гладкой мышцы в %. За 100 % приняты ответы гладкой мышцы, полученные при постганглионарной стимуляции без обработки атропином.

«Трахея с/г.» - трахея с ганглиями

«Трахея б/г» - трахея без ганглиев

«Бронхи с/г.» - бронхи с ганглиями

«Бронхи б/г.» - бронхи без ганглиев

\*\* - достоверное ( $P < 0,015$ ) отличие от контроля

Блокада нервно-мышечной передачи атропином практически не изменяла амплитуды расслабления всех препаратов трахеи и бронхов.

***Активность гладкой мышцы трахеи и бронхов при стимуляции постганглионарных нервов, активации С-волокон капсаицином и изоляции ганглиев***

При постганглионарной стимуляции и активации С-волокон капсаицином атропин вызывает достоверное снижение ( $P < 0,05$ ) сократительных ответов гладкой мышцы трахеи и бронхов (рис. 3.26).

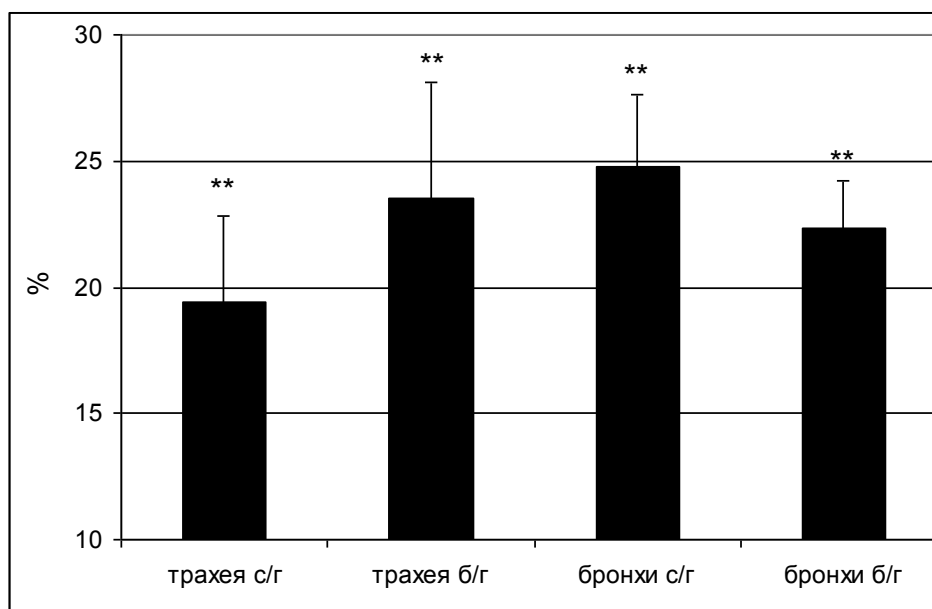


Рис. 3.26. Влияние блокады нервно-мышечной передачи атропином на сократительные ответы гладкой мускулатуры трахеи и бронхов при постганглионарной стимуляции и активации С-волокон капсаицином.

По оси абсцисс обозначены используемые препараты.

По оси ординат обозначены изменения ответов гладкой мышцы в %. За 100 % приняты ответы гладкой мышцы, полученные при постганглионарной стимуляции и активации С-волокон капсаицином без обработки атропином.

«Трахея с/г.» - трахея с ганглиями

«Трахея б/г» - трахея без ганглиев

«Бронхи с/г.» - бронхи с ганглиями

«Бронхи б/г.» - бронхи без ганглиев

\*\* - достоверное ( $P < 0,01$ ) отличие от контроля

Среднее значение величины сокращения трахеи с ганглиями составляло  $19,4 \pm 3,4$  %, трахеи без ганглиев –  $23,5 \pm 4,6$  %, бронхов с ганглиями –  $24,8 \pm 2,8$  %, бронхов без ганглиев –  $22,3 \pm 1,9$  %. Активация С-волокон капсаицином после обработки препаратов атропином практически не изменяла величины сокращения. Капсаицин на фоне атропина не изменял величины расслабления препаратов.

***Активность гладкой мышцы трахеи и бронхов при активации С-волокон капсаицином, блокаде Н1-рецепторов и изоляции ганглиев***

При постганглионарной стимуляции, на фоне активации С-волокон капсаицином и блокаде нервно-мышечной передачи атропином блокада Н1-рецепторов супрастином вызывала достоверное ( $P < 0,05$ ) понижение сократительной активности гладкой мышцы трахеи и бронхов (рис. 3.27). Сократительные ответы трахеи с ганглиями понижались до  $8,4 \pm 2,3$  %, трахеи без ганглиев до  $9,1 \pm 3,9$  %, бронхов с ганглиями до  $16,0 \pm 1,6$  % и бронхов без ганглиев до  $15,2 \pm 1,4$  %. Гистаминовые Н1-рецепторы располагаются на гладкомышечных клетках и постганглионарных холинергических нервных окончаниях. Мышечные Н1-рецепторы реагируют главным образом на высокие концентрации гистамина, а Н1-рецепторы, расположенные на постганглионарных холинергических нервных окончаниях обладают являются высокочувствительными к гистамину и усиливают выход ацетилхолина из нервных окончаний.

Можно предположить, что в наших условиях 1мкг атропина полностью не блокирует нервно-мышечную передачу и, поэтому блокада Н1-рецепторов приводит к уменьшению сокращения, вызываемого стимуляцией постганглионарных нервов. Достоверных изменений между препаратами с

ганглиями и без ганглиев не наблюдалось. На препаратах трахеи снижение ответов было выражено сильнее, чем на препаратах бронхов.

Блокада нервно-мышечной передачи атропином практически не изменяла амплитуды расслабления всех препаратов трахеи и бронхов.

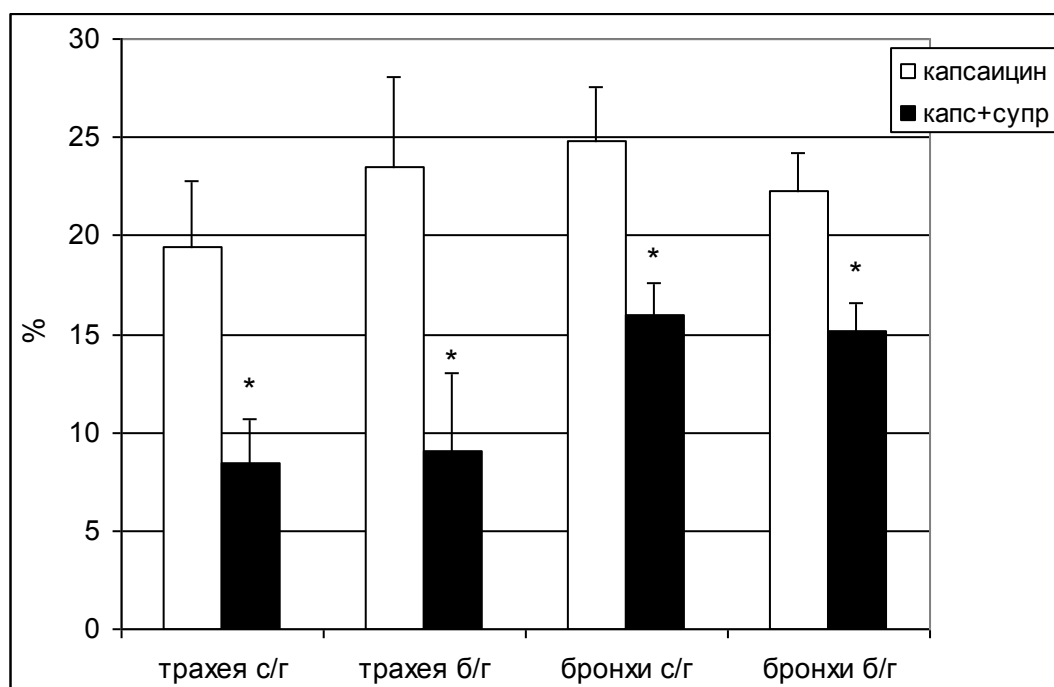


Рис. 3.27 Влияние блокады Н1-рецепторов супрастином на сократительные ответы гладкой мышцы трахеи и бронхов при постганглионарной стимуляции, активации С-волокон капсаицином и блокаде нервно-мышечной передачи.

По оси абсцисс обозначены используемые препараты.

По оси ординат обозначены изменения ответов гладкой мышцы в %. За 100 % приняты ответы гладкой мышцы, полученные при постганглионарной стимуляции и активации С-волокон капсаицином и блокаде нервно-мышечной передачи.

«Трахея с/г.» - трахея с ганглиями

«Трахея б/г» - трахея без ганглиев

«Бронхи с/г.» - бронхи с ганглиями

«Бронхи б/г.» - бронхи без ганглиев

«капс+супр» - капсаицин и супрастин, совместно введенные в ванночку.

\* - достоверное ( $P < 0,05$ ) отличие от контроля

***Активность гладкой мышцы трахеи и бронхов при активации С-волокон, блокаде, H<sub>2</sub>-рецепторов и изоляции ганглиев***

При постганглионарной стимуляции, на фоне активации С-волокон низкими концентрациями капсаицина, блокаде эпителия индометацином и блокаде H<sub>2</sub>-рецепторов циметидином, блокада ганглиев атропином вызывает достоверное ( $P < 0,05$ ) понижение сократительной активности гладкой мускулатуры трахеи и бронхов (Рис. 3.28).

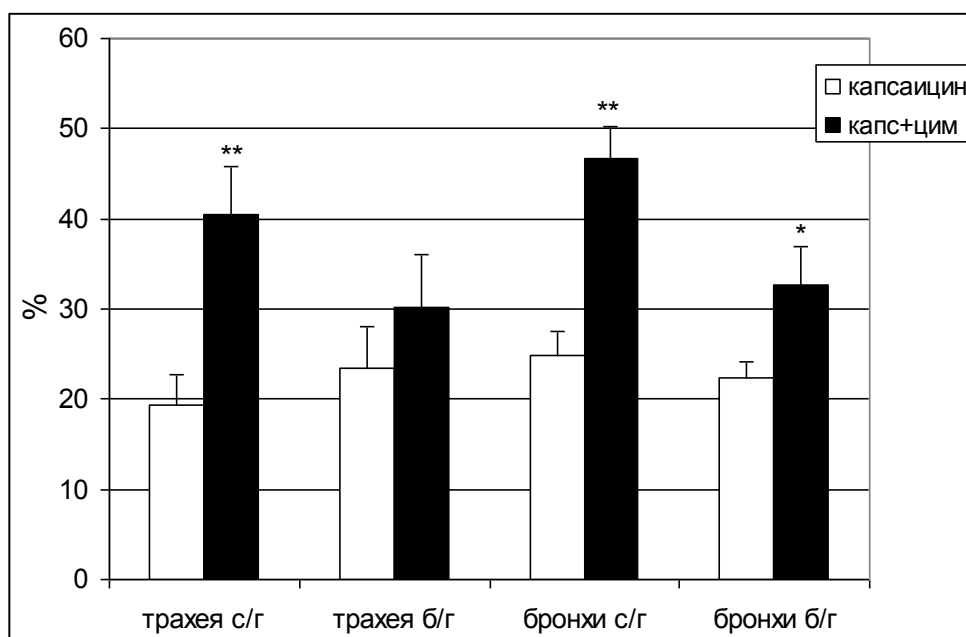


Рис. 3.28 Влияние блокады H<sub>2</sub>-рецепторов циметидином на сократительные ответы гладкой мышцы трахеи и бронхов при постганглионарной стимуляции, активации С-волокон капсаицином и блокаде нервно-мышечной передачи.

По оси абсцисс обозначены используемые препараты.

По оси ординат обозначены изменения ответов гладкой мышцы в %. За 100 % приняты ответы гладкой мышцы, полученные при постганглионарной стимуляции и активации С-волокон капсаицином и блокаде нервно-мышечной передачи.

«Трахея с/г.» - трахея с ганглиями

«Трахея б/г.» - трахея без ганглиев

«Бронхи с/г.» - бронхи с ганглиями

«Бронхи б/г.» - бронхи без ганглиев

«капс+цим» - капсаицин и циметидин, совместно введенные в ванночку.

\* и \*\* - достоверное ( $P < 0,05$  и  $P < 0,01$ , соответственно) отличие от контроля



Сократительные ответы трахеи с ганглиями понижались до  $40,5 \pm 5,3$  % (расслабление  $-14,4 \pm 5,3$  мг, латентный период  $0,77 \pm 0,23$  с), трахеи без ганглиев до  $30,2 \pm 5,8$  % (расслабление  $-15,5 \pm 2,2$  мг, латентный период  $0,88 \pm 0,31$  с), бронхов с ганглиями до  $46,7 \pm 3,6$  % (расслабление  $-15,9 \pm 2,7$  мг, латентный период  $1,4 \pm 1,13$  с) и бронхов без ганглиев до  $32,7 \pm 4,3$  % (расслабление  $-14,6 \pm 4,7$  мг, латентный период  $1,03 \pm 0,32$  с). Дилатационный эффект в препаратах трахеи достоверно ( $P < 0,05$ ) превышает расслабление ГМ бронхов.

#### **3.4.4. Активность гладкой мышцы трахеи и бронхов при совместной блокаде тучных клеток и нервно-мышечной передачи**

Для выявления роли С-волокон применялась блокада тучных клеток кромогликатом натрия и нервно-мышечной передачи атропином. Подобный эксперимент позволял исследовать роль НАНХ-системы в сокращении гладкой мускулатуры трахеи и бронхов крысы.

#### ***Активность гладкой мышцы трахеи и бронхов при совместной блокаде тучных клеток, изоляции ганглиев и активации С-волокон капсаицином***

Совместная блокада тучных клеток кромогликатом натрия и ганглиев атропином при активации С-волокон капсаицином и постганглионарной стимуляции, оказывала достоверное ( $P < 0,01$ ) увеличение сократительных ответов гладкой мускулатуры трахеи и бронхов относительно препаратов, необработанных кромогликатом натрия (рис. 3.29). Величина сокращений трахеи с ганглиями достигала  $141,0 \pm 1,4$  %, трахеи без ганглиев –  $132,9 \pm 3,3$  %, бронхов с ганглиями –  $130,1 \pm 2,6$  % и бронхов без ганглиев –  $125,5 \pm 2,8$  %. Амплитуда расслабления у всех препаратов достоверно не изменялась.

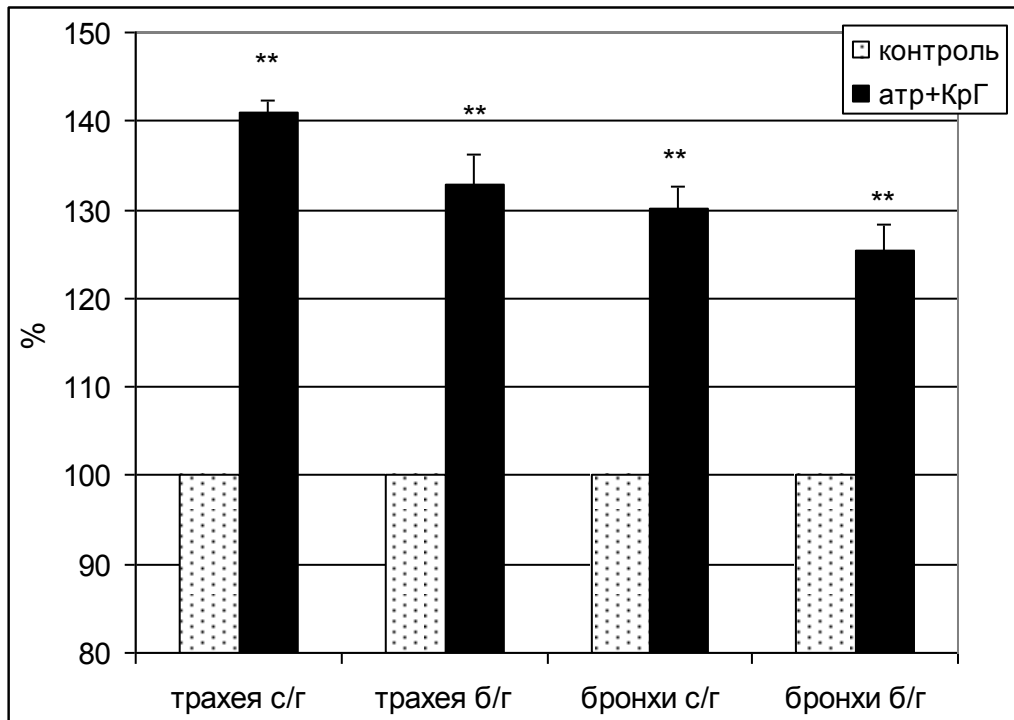


Рис. 3.29 Сократительные ответы гладкой мускулатуры трахеи и бронхов при постганглионарной стимуляции при блокаде тучных клеток кромогликатом натрия, блокаде интрамуральных ганглиев а и активации С-волокон капсаицином

По оси абсцисс обозначены используемые препараты.

По оси ординат обозначены изменения ответов гладкой мышцы в %. За 100 % приняты ответы гладкой мышцы, полученные при постганглионарной стимуляции на фоне блокады эпителия индометацином, блокады интрамуральных ганглиев и активации С-волокон капсаицином

«Трахея с/г.» - трахея с ганглиями

«Трахея б/г» - трахея без ганглиев

«Бронхи с/г.» - бронхи с ганглиями

«Бронхи б/г.» - бронхи без ганглиев

\*\* - достоверное ( $P < 0,01$ ) отличие от контроля

Блокада нервно-мышечной передачи атропином вызывала самые маленькие ответы, но при активации С-волокон капсаицином происходило их небольшое возрастание, что связано с выделением С-волокнами тахикининов (субстанции Р и нейрокина А). Различия в ответах, вызванных активацией С-волокон с участием интрамурального ганглия и без

него существенно различаются, что указывает на ведущую роль нервного пути через ганглий в сократительном ответе.

При дополнительной блокаде H1-рецепторов ответы понижались, что связано с устранением основного рецептора бронхоконстрикторного действия. По-видимому, тахикинины оказывают активирующее действие на H1рецепторы.

При блокаде H2-рецепторов в аналогичном эксперименте наблюдалось повышение ответов, что связано с устранением основного бронходилатирующего рецептора H2. Вероятно, на H2 рецепторы тахикинины так же оказывают активирующее действие.

В экспериментах с одновременной блокадой тучных клеток и прерыванием нервно-мышечной передачи, активация С-волокон давала очень сильные увеличения ответов, что по всей видимости, свидетельствует об определенном действии С-волокон на тучные клетки. Вероятно, тахикинины, выбрасываемые в ходе активации С-волокон вызывают частичную дегрануляцию тучных клеток с выбросом низких концентраций гистамина, оказывающего дилатационное действие через H2-рецепторы. Так же возможно в ходе дегрануляции тучные клетки высвобождают какие-то вещества, обеспечивающие расслабление и играющие роль в механизмах саморегуляции системы.

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 4.1. Влияние аденозина и капсаицина на препараты гладкой мышцы трахеи и бронхов

Аденозин – медиатор поздней фазы дегрануляции тучных клеток, а так же биологически активный нуклеозид образующийся в ходе катаболических процессов в организме. Так же аденозин способен активировать тучные клетки, вызывая их дегрануляцию. Таким образом, в системе нижних дыхательных путей аденозин является активным метаболитом, способным привести к IgE-независимой дегрануляции лаброцитов. Кроме того, аденозин способен возбуждать С-волокна (Chuauchoo, Lee, Kollarik, 2006) и гладкую мускулатуру (Zhou Y., Schneider, 2009). Капсаицин – чужеродное для организма соединение, и применялось нами в качестве активатора С-волокон (в малых концентрациях) или, напротив, для их истощения и блокады (высокие дозы капсаицина).

Аденозин при стимуляции нервов и мышцы трахеи и бронхов вызывал двухфазные реакции, в которых увеличение сократительных ответов сменялось их уменьшением. По всей вероятности, аденозин оказывая влияние на тучные клетки, С-волокна и гладкую мышцу, вызывает увеличения сократительных ответов. Это возможно, поскольку все эти структуры имеют рецепторы к аденозину. Кроме того, тучные клетки близко подходят к С-волоконкам и гладкой мышце, и при аппликации аденозина на препарат он мог действовать на все эти структуры (Alving K, Sundström C, 1991). Активация С-волокон капсаицином при всех видах стимуляции так же давала двухфазную реакцию. В литературе имеются сведения о том, что тахикинины - вещество Р (SP) и нейрокинин А, выделяемые при активации С-волокон, приводят к бронхоконстрикции различными путями: прямо воздействуя на мышцу через нейрокининовые рецепторы, опосредованно через местный рефлекс и косвенно через активацию тучных клеток с

последующей их дегрануляцией (Joos GF, Pauwels, 1993; Joos GF, Lefebvre, 1997). Различий в величине ответов первой и второй фаз сокращения в препаратах трахеи и бронхов на фоне аденозина и капсаицина не было, что говорит о значительной роли С-волокон в развитии сократительной реакции.

Блокада С-волокон не изменяла двухфазной реакции аденозина в препаратах трахеи при стимуляции нервов, но увеличивала величину первой фазы и не влияла на величину второй фазы. Усиление ответов на аденозин при блокаде С-волокон может свидетельствовать об аденозин-индуированной дегрануляции тучных клеток и о наличии каких-либо дилатирующих механизмов, связанных с С-волоконками (Reynolds S. M., R. Docherty, 2008). При стимуляции мышцы наблюдались лишь незначительные колебания амплитуды сокращения относительно фона.

В препаратах бронхов блокада С-волокон аналогично влияла на ответы, вызванные аденозином при стимуляции нервов, при стимуляции мышцы блокада С-волокон приводила к уменьшению ответов.

При одновременной блокаде С-волокон и тучных клеток при стимуляции нервов наблюдалось увеличение ответов; при стимуляции мышцы наблюдались лишь незначительные колебания амплитуды сокращения относительно фона. Увеличение ответов при стимуляции нервов свидетельствуют о том, что аденозин оказывает влияние на аденозиновые рецепторы гладкой мышцы.

Таким образом, аденозин оказывает влияние на различные структуры респираторного тракта, вызывая сокращение гладкой мышцы. Аденозин влияет на тучные клетки, приводя к их частичной дегрануляции с выбросом гистамина, воздействующего на гистаминовые рецепторы с запуском рефлекторных цепей через нейроны интрамурального ганглия. Аденозин воздействует на С-волокна, вызывая выброс тахикининов, прямо воздействующих на нейрокининовые рецепторы мышцы 2-типа или же

запускающие рефлекторный путь через нейроны функционального модуля. Кроме того, аденозин воздействует прямо на гладкую мышцу через аденозиновые рецепторы.

#### 4.2 Роль блокады эпителия в реакции гладкой мышцы

Респираторный эпителий играет большую роль в функционировании дыхательных путей, а также в развитии воспаления и бронхоспазма. В наших исследованиях эпителий усиливал сократительные ответы гладкой мышцы, а при его блокаде ответы уменьшались. Вероятно, его бронхоконстрикторное действие связано с синтезом простагландинов усиливающих сокращение гладкой мускулатуры ( $\text{PGF}_{2\alpha}$  и других). Armour и Johnson в своих исследованиях на препаратах кролика показали, что сокращения, вызываемые пре- и пост-ганглионарным стимулированием потенцировались простгландином F2 альфа ( $\text{PGF}_{2\alpha}$ ), вследствие чего наблюдалось их увеличение.  $\text{PGF}_{2\alpha}$  также потенцировал сокращения на внешний ацетилхолин в изолированных неиннервированных сегментах трахеи. Это говорит о том, что действие  $\text{PGF}_{2\alpha}$  связано непосредственно с гладкой мышцей. Эти эффекты  $\text{PGF}_{2\alpha}$  могут быть важными при воспалении, которое сопровождает патологии респираторного тракта (Armour CL, Johnson PR, 1988). В наших экспериментах при блокаде эпителия индометацином, констрикторный эффект аденозина достоверно ( $P < 0,05$ ) уменьшался. Достоверно уменьшались величины сокращения первой и второй фаз сокращения, что свидетельствует о том, что ингибирование синтеза простагландинов оказывает подавляющее действие на эффект аденозина.

Блокада синтеза простагландинов понижала величины ответов трахеи и бронхов в первой и второй фазах реакции, вызванных аденозином.

При блокаде синтеза простагландинов индометацином на фоне активации С-волокон капсаицином в препаратах с ганглиями развивалась двухфазная реакция: сокращение сменялось расслаблением.

При сравнении результатов эксперимента по влиянию одного только капсаицина и эксперимента по влиянию капсаицина на фоне индометацина, достоверных отличий не наблюдалось, что свидетельствует о том, что блокада синтеза простагландинов индометацином не влияла на действие капсаицина. По всей видимости, эпителиальные простагландины в данных экспериментальных условиях не оказывают какого-либо эффекта на систему нижних дыхательных путей и в частности на синтез тахикининов С-волоконнами.

Исследования, проведенные Jolly и Desmecht на изолированных препаратах без применения стимуляции нервов, свидетельствуют о противоположном эффекте эпителия. При механическом удалении эпителиального слоя с препаратов трахеи и бронхов быка регистрировалось повышение сократительных ответов. Они утверждают, что эпителий обладает релаксационным эффектом на гладкую мышцу, который является независимым от H<sub>2</sub> и H<sub>3</sub> рецепторов (Jolly S, Desmecht D., 2003). Loenders и Jorens в своих опытах на морской свинке получили несколько иные результаты. Клетки эпителиального слоя оказывали пресинаптическое тормозное влияние на выпуск ацетилхолина, вызванный хлоридом калия и электрическим стимулированием, с уменьшением сокращения гладкой мышцы. Ответы, вызванные внешним ацетилхолином, действующие постсинаптически, также тормозились в присутствии эпителия. Однако, эпителиальный эффект не объяснялся производством тормозных простагландинов или синтеза оксида азота. Кроме того, эпителий не функционировал как метаболический сайт для разложения ацетилхолина, что указывает на значительную роль каких-то других механизмов в действии эпителия (Loenders B, Jorens PG, 1996). Расхождение результатов, полученных нами, с результатами Jolly и Desmecht, Loenders и Jorens можно объяснить высокой специфичностью функциональных показателей эпителия у различных групп животных.

Бронхиальный эпителий выделяет провоспалительные цитокины, простагландины, бронхоконстриктор эндотелин и бронходилатирующий оксид азота, а так же другие биологически активные факторы. Однако полная роль эпителия в механизмах гиперреактивности и бронхоконстрикции у различных видов животных и человека остается не выясненной. Практически нет исследований, раскрывающих роль эпителия при блокаде синтеза простагландинов индометацином на фоне воздействия капсаицином или аденозином в сократительных ответах гладкой мускулатуры крысы.

#### **4.3 Роль блокады гистаминовых рецепторов в реакции гладкой мышцы**

Гистамин вызывает разнообразные ответы в дыхательных путях у разных видов животных. Эффекты действия гистамина зависят от его концентрации и типа рецепторов. При блокаде тормозных гистаминовых рецепторов в гладкой мышце развивается увеличение сократительных ответов, а при блокаде возбуждающих – уменьшение сокращения.

В наших исследованиях блокада H1-рецепторов супрастином приводила к снижению сократительных ответов трахеи и бронхов, вызываемых стимуляцией постганглионарных нервов, что согласуется с литературными данными о бронхоконстрикторном значении H1-рецепторов (Matsumoto, Kanno, 1993; Федин, Крюкова, 2003; Bayat, Porra, 2006). Блокада H2-рецепторов циметидином приводила к увеличению сокращения трахеи и бронхов с ганглиями, что соответствует сведениям, имеющимся в литературе о бронходилатационном значении H2 рецепторов (Федин, Алиева, Ноздрачев, 1997; Федин, Крюкова, 2003; Jolly, Desmecht, 2003). Препараты без ганглиев практически не проявляли усиление сократительных ответов, что может свидетельствовать о том, что плотность H1-рецепторов ниже на препаратах без ганглиев. Это можно связать с жесткой структурой



проксимального отдела трахеи и пониженной ее реактивностью. Так же это доказывает связь H1-рецепторов с нейрональными структурами.

В наших экспериментах блокада H2-рецепторов не изменяла фазы усиления действия аденозина в ответах гладкой мышцы трахеи, но увеличивала сократительные ответы в препаратах бронхов. Блокада H2-рецепторов снимала фазу снижения сокращения на трахее и бронхах, вызванную аденозином. Следует заметить, что в данных экспериментах применяемый нуклеозид аденозин оказывал мультинаправленное действие. Он активировал C-волокна, стимулируя выброс тахикининов (Chuauchoo, Lee, Kollarik, 2006; Keir, Boswell-Smith, 2006). Аденозин активировал тучные клетки с выбросом небольших концентраций гистамина (Baraldi, Cacciari, 2000; Anvari, Sharma, 2010; Zhou Y., Schneider, 2009). По предварительным нашим экспериментам масса гистамина, выделяемая при дегрануляции тучных клеток в данных экспериментах, считается достаточно небольшой и равняется 5 – 10 мкг. Так же аденозин влиял на саму гладкую мышцу (Vass, Horváth, 2008). Соответственно, можно предположить, что в препаратах трахеи в первую фазу реакции отсутствие усиления может быть связано с активацией аденозином C-волокон и соответственно с дилатационными H3-рецепторами. Так же различия в результатах эксперимента можно объяснить различным соотношением аденозиновых A1, A2 и A3 рецепторов на протяжении всего респираторного тракта крысы (Auchampach, Gross, 2005; Baraldi P.G., Cacciari B., 2000).

Блокада H1-рецепторов на фоне действия аденозина и циметидина вызывала однофазный дилатационный ответ. Следовательно, фаза усиления в действии аденозина определяется H1-рецепторами. Возможно, что в системе нижних дыхательных путей при постангионарной стимуляции основной мишенью для гистамина, выделяемого в ходе дегрануляции тучных клеток, являются именно H1-рецепторы, играющие основную модулирующую роль в сокращении гладкой мышцы.

Блокада H<sub>2</sub>-рецепторов на фоне активации С-волокон капсаицином в препаратах с ганглиями уменьшала ответы во вторую фазу реакции в бронхах и трахее, по сравнению с одним капсаицином (Рис. 1). Можно предположить, что в ответе гладкой мышцы, опосредованном активацией С-волокон, H<sub>2</sub>-рецепторы принимают участие. В препаратах без ганглиев складывалась иная ситуация: блокада H<sub>2</sub>-рецепторов вызывала увеличение ответов с появлением двухфазности. Это закономерно, так как H<sub>2</sub>-рецепторы оказывают дилатирующий эффект, и при их блокаде происходит увеличение ответов мышцы. В препаратах с ганглиями дилатационный эффект принадлежит не только H<sub>2</sub>-рецепторам, но и иным рецепторам, которые в условиях данного эксперимента оказались незаблокированными. Такими рецепторами могут быть тормозные H<sub>3</sub>-гистаминовые рецепторы, модулирующие ацетилхолиновую нейротрансмиссию, на парасимпатических нейронах интрамуральных ганглиев, а также тормозные H<sub>3</sub>-гистаминовые рецепторы, располагающиеся на афферентных нервных окончаниях и тормозящие выпуск медиатора из сенсорных нервов. Кроме того, это может свидетельствовать о различной плотности рецепторов бронхострикторного действия на различных сегментах респираторного тракта. Подобные явления описаны в работах отечественных физиологов, где говорится о том, что разнообразие изменений ответов трахеи и бронхов на гистамин, вероятно, объясняется различным количеством H<sub>1</sub> и H<sub>2</sub>-рецепторов на постганглионарных нервных окончаниях, существенной ролью H<sub>3</sub>-рецепторов и влиянием нейронов интрамуральных ганглиев (Федин, Алиева, Ноздрачев, 1997; 2003).

Одновременная блокада H<sub>1</sub> и H<sub>2</sub>-рецепторов на фоне активации С-волокон капсаицином вызывала только понижение сократительных ответов. Подобная дилатация обеспечена устранением влияния бронхостриктурирующего влияния, опосредованного H<sub>1</sub>-рецепторами.

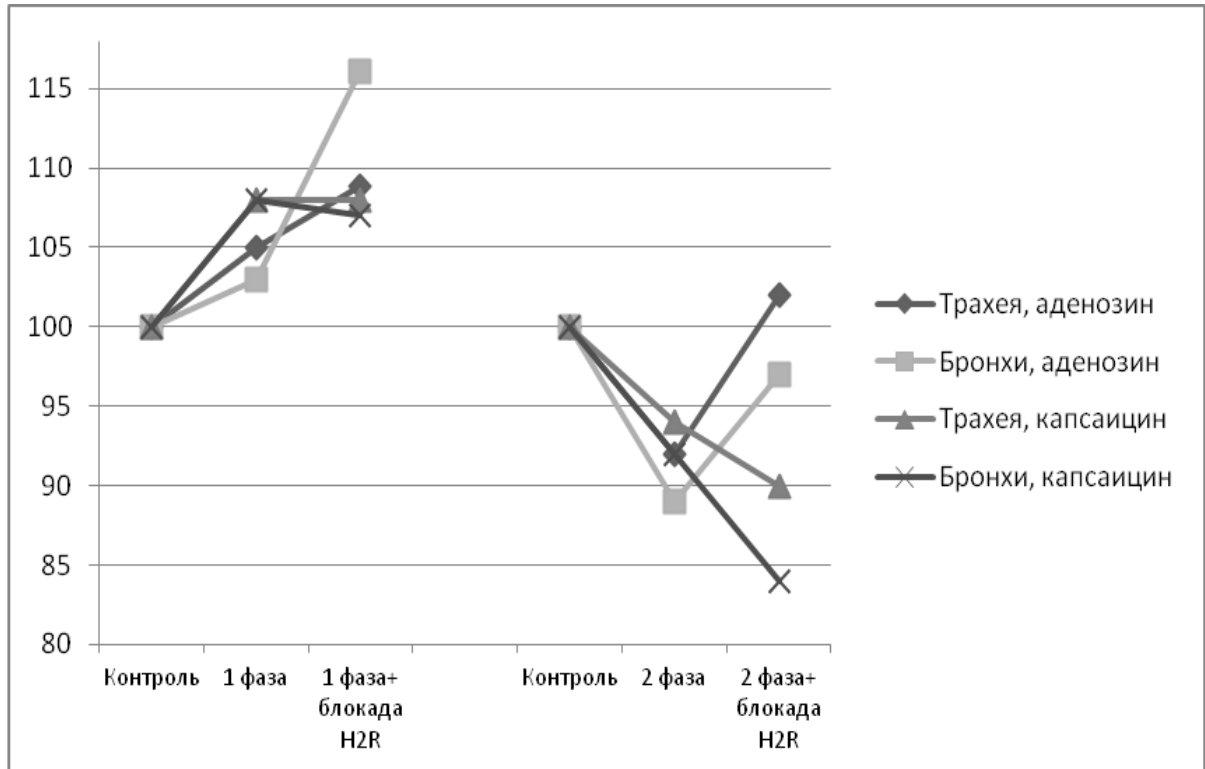


Рис. 4.1 Влияние блокады H<sub>2</sub>-рецепторов циметидином на первую и вторую фазы сокращения, вызванные аденозином и капсаицином

При сравнении ответов препаратов с ганглиями на аденозин и капсаицин можно заключить, что блокада H<sub>1</sub>-рецепторов давала только снижение ответов, в то время как блокада H<sub>2</sub>-рецепторов вызывала более сложную реакцию. Блокада H<sub>2</sub>-рецепторов не оказывала действие на первую фазу сокращения при действии капсаицина и усиливала эту фазу в действии аденозина в препаратах бронхов. На вторую фазу реакции блокада H<sub>2</sub>-рецепторов снимала снижение ответов на аденозин в трахее и бронхах. Ни на первую ни на вторую фазы реакции, опосредованные активацией С-волокон капсаицином, блокада H<sub>2</sub>-рецепторов не оказывала влияния. Возможно это указывает на то, что эффекты активации С-волокон не связаны с H<sub>2</sub>-рецепторами.

К сожалению, в доступной нам литературе, мы не обнаружили сведений о блокаде H<sub>1</sub>- и H<sub>2</sub>-рецепторов на фоне аденозина или капсаицина.

Таким образом, эндогенный гистамин, выделяющийся вследствие

аденозин–индуцированной или тахикинин-индуцированной (вследствие активации С-волокон) дегрануляции лаброцитов, оказывает влияние на Н1, Н2 и Н3-рецепторы. Следовательно в нормальных физиологических условиях гистамин, выделяющийся в ходе частичной дегрануляции вызывает небольшие сокращения гладкой мышцы, опосредованные Н1-рецепторами, и незначительную мышечную дилатацию за счет Н2 и Н3-рецепторов.

#### **4.4 Роль блокады С-волокон, тучных клеток и нервно-мышечной передачи в реакции гладкой мышцы**

Функционирование нейронов интрамурального ганглия, С-волокон и тучных клеток во многом определяет реакцию гладкой мышцы нижних дыхательных путей. При блокаде тучных клеток и звеньев функционального модуля на фоне стимуляции постганглионарных нервов развиваются различные сократительные ответы.

В наших экспериментах блокада С-волокон снижала ответы гладкой мышцы, вызванные стимуляцией постганглионарных нервов при влиянии аденозина и циметидина. Вероятно, двухфазность реакции, вызванной одним только аденозином, была связана с активацией С-волокон НАНХ системы, обеспечивающих сначала бронхоконстрикцию за счет активации нейрокининовых рецепторов 2-типа, затем бронходилатацию за счет выделения NO и VIP, активации Н3, а так же Н2 рецепторов. Сведения о возбуждающем влиянии тахикининов С-волокон, и в частности нейрокина А, на нейрокининовые рецепторы 2-типа с развитием последующей констрикции подтверждаются в работах Elekes K, Helyes Z (2007), Kevin Kwong, Zhong-Xin Wu (2001), Joos GF, Pauwels RA (1998). Данные о дилатационном действии NO и VIP приводятся в работах Belvisi (1993), Tamaoki (1994), Colasurdo, 1995) и других. Однако в указанных работах и других подобных исследованиях эксперименты проводились без применения постганглионарной стимуляции, что повышает значимость наших

результатов, полученных в условиях наиболее приближенных к естественным.

Блокада стреч-рецепторов снижала ответы гладкой мышцы на фоне действия аденозина, блокады С-волокон и H<sub>2</sub>-рецепторов в препаратах с ганглиями, что свидетельствует о том, что активация стреч-рецепторов аденозином или гистамином вызывает констрикторный эффект. Аналогичные результаты о возбуждающем влиянии ингалированного аденозина на стреч-рецепторы были получены Reynolds и Docherty (2008) в условиях *in vivo* на морских свинках. Также имеются сведения об увеличении сократительных ответов вследствие гистаминергических реакций гладкой мышцы, опосредованных трахеобронхиальными быстро и медленно адаптирующиеся стретч-рецепторами на изолированных препаратах трахеи и бронхов крысы с применением постганглианной стимуляции (Федин, Алиева, Ноздрачев, 1997).

Блокада нервно-мышечной передачи атропином значительно снижала ответы гладкой мышцы при постганглионарной стимуляции. Тем не менее, небольшие ответы все же сохранялись. Вероятно, они связаны с недостаточно высокой концентрацией атропина. Активация С-волокон капсаицином увеличивала ответы на фоне атропина. По всей видимости, при активации С-волокон увеличение ответов происходило за счет выделения нейрокининов А, оказывающих возбуждающее действие на нейрокининовые рецепторы 2-типа и через рефлекторный путь, опосредованный нейронами функционального модуля. Сведения о двойном пути влияния С-волокон на мышцу трахеи и бронхов крыс в условиях *in vivo* раскрыты в работе Joos GF, Pauwels RA (1993). Сведений о влиянии активированных С-волокон на фоне атропина на изолированные препараты трахеи и бронхов с применением постганглионарной стимуляции нам не удалось обнаружить.

Одновременная блокада нервно-мышечной передачи и стабилизация мембраны тучных клеток значительно увеличивали ответы, вызванные

активацией С-волокон на фоне атропина. Возможно, тучные клетки при электрической стимуляции постганглионарных нервов и умеренной дегрануляции, наблюдаемой в наших экспериментальных условиях, оказывают дилатирующий эффект на гладкую мышцу. Этот эффект вероятнее всего связан с Н2 и Н3-рецепторами, но возможно и с другими рецепторами, взаимодействующими с медиаторами, выделяемыми в ходе частичной дегрануляции лаброцитов. В литературе нам не удалось найти сведений о влиянии стабилизации мембран тучных клеток на сокращения гладкой мускулатуры нижних дыхательных путей в нормальных физиологических условиях.

Стабилизация тучных клеток на фоне блокады Н2-рецепторов и активации С-волокон, вызывала однофазовое увеличение ответов гладкой мышцы. При сравнении этих ответов с результатами в аналогичных опытах, но без блокады тучных клеток и Н2-рецепторов, мы наблюдали значительно меньшие ответы. Вероятно, в нижних дыхательных путях в нормальных физиологических условиях существует определенная связь между тучными клетками и функциональным модулем. Гистамин, выделяющийся в ходе частичной дегрануляции тучных клеток, опосредованной тахикининами, оказывал дилатирующее действие через взаимодействие с Н2 и Н3-рецепторами.

Таким образом, в условиях физиологической нормы, нейроны метасимпатического ганглия, сенсорные волокна, стреч-рецепторы и лаброциты играют следующую роль в гладкомышечном сокращении: активированные С-волокна и стреч-рецепторы вызывают увеличение сокращения гладкой мышцы; тучные клетки при частичной дегрануляции вызывают дилатационный эффект; основное значение в сократительном ответе принадлежит нейронам интрамурального ганглия.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Можно заключить, что изучение особенностей эколого-физиологического взаимодействия внешних факторов среды, тучных клеток, нейронов интрамуральных ганглиев, эпителия и гладкой мускулатуры нижних дыхательных путей представляет высокое значение для раскрытия подробных механизмов бронхоконстрикции, лежащей в основе патогенеза астмы и обструктивных болезней легких. В настоящее время моделирование влияния внешних факторов на состояние нервной системы встречается достаточно широко (Ахметзянова С.В., Киблер Н.А., Нужный В.П., 2014; Ордян Н.Э., Пивина С.Г. и др., 2014; Allen C. Myers, 2002; Anvari F, Sharma AK, 2010), но экспериментальной модели, аналогичной нашей, мы не обнаружили.

Большой вклад в развитие этой проблемы внесен благодаря исследованиям, проводимым в Институте физиологии им. И. П. Павлова РАН и Институте эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН (Александрова Н. П., 2004; Варламова Н.Г., Бойко Е.Р., 2014) Дворецкий Д.П., 2001; Ноздрачев А.Д., 2001; Мостивенко К.К., Рощевская И.М., Нужный В.П., Шмаков Д.Н., 2001; Федин А. Н., 2009; Шуваев В.Т., Астащенко А.П. и др., 2009; Любашина О.А. и др., 2010).

Наше исследование позволило установить некоторые особенности нейро-иммунного воздействия на сокращения гладкой мускулатуры трахеи и бронхов крысы в условиях физиологической нормы с учетом моделирования умеренного воздействия внешнего фактора (влияние аденозина, капсаицина). Нам удалось показать роль тучных клеток в сокращении гладкой мускулатуры, а также обозначить возможные пути взаимодействия лаброцитов с нейронами метасимпатического ганглия. Таким образом, исследование является законченным результатом диссертационной работы.

## ВЫВОДЫ

1. Аденозин и капсаицин – активируют структуры нервной и иммунной систем в нижних дыхательных путях, вызывая двухфазные реакции, в которых увеличение сокращения сменяется его снижением. Аденозин активирует С-волокна, тучные клетки, гладкую мышцу, эпителий и стреч-рецепторы, что связано с наличием в составе этих структур аденозиновых рецепторов возбуждающего типа.
2. Эпителиальные простагландины оказывают констрикторное действие на гладкую мускулатуру трахеи и бронхов крысы, что связано с преобладанием простагландинов констрикторного действия –  $\text{PGF}_2\alpha$  и других. При ингибировании синтеза эпителиальных простагландинов бронхоконстрикторный эффект аденозина сохраняется. Констрикторный эффект капсаицина в отсутствие простагландинов сохраняется только в препаратах трахеи и бронхов с интрамуральными ганглиями; в препаратах без ганглиев констрикторное действие капсаицина исчезает.
3. Гистаминовые  $\text{H}_1$ -рецепторы опосредуют увеличение сокращения и их блокада супрастином вызывает снижение ответов гладкой мышцы, вызванных эндогенным ацетилхолином, при действии аденозина и капсаицина. Гистаминовые  $\text{H}_2$ -рецепторы опосредуют дилатационный эффект и их блокада вызывает возрастание ответов в препаратах бронхов при стимуляции нервов на фоне действия аденозина; однако в препаратах трахеи подобного эффекта не наблюдалось. На фоне активации С-волокон капсаицином блокада  $\text{H}_2$ -рецепторов не изменяла величину сокращения.



4. Активация С-волокон аналогами отрицательных экологических факторов приводит к их возбуждению и увеличению сокращения. Блокада С-волокон вызывает снижение ответов. Блокада нервно-мышечной передачи вызывает сильное снижение ответов, но одновременная стабилизация мембран тучных клеток и прерывание нервно-мышечной передачи приводили к их увеличению, что может свидетельствовать о провокационном действии малых доз аденозина и капсаицина на тучные клетки, опосредующие в условиях физиологической нормы дилатирующий эффект.

5. Аналоги факторов внешней среды – аденозин и капсаицин – активируют тучные клетки и С-волокон нижних дыхательных путей. Аденозин влияет на гладкую мышцу как непосредственно, так и опосредованно через активацию тучных клеток с выделением гистамина и активацию С-волокон с выделением тахикининов, а так же рефлекторным путем через нейроны интрамурального ганглия. Капсаицин действует на гладкую мышцу, активируя С-волокна с высвобождением ими тахикининов, и рефлекторно через нейроны интрамуральных ганглиев, а так же через активацию тучных клеток с выделением гистамина.

**ИСПОЛЬЗУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА**

1. Агаджанян Н.А., Александров С.И., Аптикаева О.И., Гаврилова Т.В., Гамбурцев А.Г. и др. Экология человека в изменяющемся мире, -Под ред. В.А. Черешнева.–Екатеринбург: УрО РАН, 2006. –562 с.
2. Агаджанян Н.А., Григорьев А.И., Черешнев В.А., Сидоров П.И. и др. Экология человека. Учебник.–М. : Изд-во ГЭОТАР-Медиа, 2008. –240 с.
3. Агаджанян Н.А., Уйба В.В., Куликова М.П., Кочеткова А.В. Актуальные проблемы адаптационной, экологической и восстановительной медицины. –М.: Медика, 2006. – 208 с.
4. Адельман Д., А. Сэксон. Основные представления об аллергических реакциях немедленного типа. Клиническая иммунология и аллергология. Москва, «Практика», 2000, 278 с.
5. Александров В. Г, Александрова Н.П., Туманова Т. С., Евсеева А. Д., Меркурьев В. А. Участие NO-эргических механизмов в реализации респираторных эффектов провоспалительного цитокина интерлейкина-1 $\beta$ . Российский физиол.журнал им. И. М. Сеченова. 2015. Т. 101. №12. С. 1372 – 1384.
6. Александрова Н.П. Роль афферентной системы легких в обеспечении стабильности верхних дыхательных путей при обструктивном дыхании. Физиол.о-во им.И.П.Павлова.Съезд,Х I Х.Тез.докл.Ч.1.-СПб.-2004.-С.510.- (Рос.физиол.журн.им.И.М.Сеченова.2004.Т.90,№8.Прил.).
7. Александрова Н.П., Меркурьев В. А., Туманова Т. С., Александров В.Г. Механизмы модуляции рефлекторного контроля дыхания при повышении системного уровня провоспалительного цитокина интерлейкина-1 $\beta$ . Российский физиол.журнал им. И. М. Сеченова. 2015. Т. 101. №10. С. 1158 – 1168.
8. Бойко Е.Р., Паршукова О.И., Бойко С.Г., Потолицына Н.Н., Канева А.М., Зеленов В.А., Вебер П.А., Янов Ю.К. Функциональная роль метаболитов оксида азота в патогенезе острой сенсоневральной тугоухости. Рос. оториноларинг. 2014. № 4 (71). С. 16-21 (РИНЦ – 0,151).
9. Бронхиальная астма,- под ред. А.Г. Чучалина. – Т. 1. – М.: Агар, 1997. – 431с.
10. Варламова Н.Г., Рогачевская О.В., Бойко Е.Р. Функция внешнего дыхания у юношей и девушек в тепле и на холоде. Изв. Коми научн. центра УрО РАН. 2014. Вып. 2(18). С. 50-54. (РИНЦ – 0,126).

11. Гавалов С. М. Гиперреактивность бронхов как один из ведущих патофизиологических механизмов в возникновении "рецидивов" бронхолегочных заболеваний у детей, перенесших пневмонию или ОРВИ. - Детский доктор, 1999, 4, с. 19-23.
12. Гавалов С.М. Аллергозы дыхательной системы у детей, Здоровоохранение Белоруссии, 1976, N10, С. 3-9.
13. Гавалов С.М., Казначеева Л.Ф. Новые концепции рецидивов после острых бронхолегочных заболеваний у детей, МРЖ, Р. V. 1983, С. 19.
14. Гавалов С.М., Казначеева Л.Ф. Патогенетические основы рецидивов после острой пневмонии у детей, В кн.; Вопросы реактивности и адаптации в педиатрии, Сб. статей, Свердловск, 1979, С. 36-42.
15. Гусев Н. Б. Внутриклеточные Са-связывающие белки. Соросовский Образовательный Журнал. 1988. № 5. С. 2 – 16.
16. Гусев Н. Б. Молекулярные механизмы мышечного сокращения. Соросовский Образовательный Журнал, т. 6, № 8, 2000. С. 24 – 32.
17. Дворецкий Д.П., Ярцев В.Н., Караченцева О.В. Реактивность кровеносных сосудов *in vitro* : сопряжение ее пиковой величины со спецификой стимула и предстимульным растяжением миоцитов. Физиологическое общество им.И.П.Павлова.Съезд XVIII :Тез.докл.-Казань,М. : ГЭОТАР-МЕД, 2001. С.331-332.
18. Золотарев В.А., Ноздрачев А.Д. Капсаицин-чувствительные афференты блуждающего нерва. Росс. Физиол. журнал, 2001, т. 87, №2 с. 182-204.
19. Каркищенко Н.Н. Психоунитропизм лекарственных средств. – М.: Медицина, 1993. 205 с.
20. Коган А.Б. Экологическая физиология человека Ростов: РГУ, 1990. - 264 с.
21. Крюкова Е.Н., Карпушев А.В., Фролова С.А., Федин А.Н. Влияние гистамина на длительность фаз дыхательного цикла. Российский физиол. журн. им. И.М.Сеченова. 2001. 87(3). 410-417.
22. Кузубова Н.А., Лебедева Е.С., Федин А.Н., Двораковская И.В., Титова О.Н. Протекторное действие фенспирида на бронхи крыс с хронической обструктивной болезнью легких. Бюлл. Эксперимент. Биол. и Мед. 2013, т. 155, № 2, с. 179-184.
23. (Кузубова) Kuzubova N. A., E. S. Lebedeva, A. N. Fedin, I. V. Dvorakovskaya, T. N. Preobrazhenskaya, O. N. Titova. Effect of fenspiride on bronchial smooth muscles of rats with chronic obstructive pulmonary disease. J. Smooth Muscle search. 2013. v. 149. p. 46-54

24. Лолор Г, Тэшкин Д. Бронхиальная астма. Москва, «Практика», 2000, 322 с.
25. Мостивенко К.К., Рощевская И.М., Нужный В.П., Шмаков Д.Н., Рощевский М.П. Отображение на поверхности туловища собаки распределения потенциала на эпикарде желудочков при электрической стимуляции миокарда . Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2001. Т. 87, № 5. С. 620-627.
26. Ноздрачев А.Д., Федин А.Н., Самойлова Л.А., Степанова Т.П. Фоновая активность нейронов трахеального сплетения крысы. Физиол.журн.СССР.-1985.-Т.71(6).-С.724-730
27. Ноздрачев А.Д.,Толкунов Ю.А. Первичные афферентные нейроны тонкой кишки. Проблемы регуляции висцеральных функций : Сб. науч. статей, посвящ. 80-летию НАН Беларуси; В 2-х книгах / Ред. кол. В.С.Улащик и др. – Минск:РИВШ, 2008. Кн.1. С.116-122.
28. Ордян Н.Э., Пивина С.Г., Миронова В.И., Ракицкая В.В., Акулова В.К. Активность гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной системы пренатально стрессированных самок крыс в модели посттравматического стрессового расстройства . Рос. физиол. журн. им. И.М.Сеченова. - 2014. - Т.100, № 12. – С. 1409-1420.
29. Поленов С.А., Дворецкий Д.П., Чернявская Г.В. Вазомоторные эффекты нейропептидов. Физиол. журнал им. И.М. Сеченова, 1995, т. 81, №6, с. 29-47.
30. Силантьев А. Н., Силантьев М. Н. Экологическая физиология человека и животных с основами биометеорологии: учебное пособие для студентов высших учебных заведений. – Майкоп: Издательство АГУ, 2011. – 200 с.
31. Сотников О.С., Лукашин В.Г., Арчакова Л.И.,Соловьева И.А. Морфометрия и кинетическая трактовка различий асинаптических дендритов местных и спинальных сенсорных нейронов кишечника. Сенсорные системы.2008.Т.22,№4.С.342-348.
32. Федин А. Н. Функциональный модуль дыхательных путей и патология легких. – Механизмы функционирования висцеральных систем, Спб., 2009, с 428 – 429
33. Федин А.Н. Периферические нервные механизмы, регулирующие дыхание. XIV международное совещание и VII школа по эволюционной физиологии. СПб. 2011. С. 190.

34. Федин А.Н. Функциональные характеристики нейронов ганглиев нижних дыхательных путей. Успехи физиол. наук. 32(1) : 96-109, 2001.
35. Федин А.Н., Алиева Е.В., Ноздрачев А.Д. Механизмы действия гистамина на гладкую мышцу трахеи. Российский физиол. журн.-1997.-т. 83(7),.-С.102-108.
36. Федин А.Н., Алиева Е.В., Ноздрачев А.Д. Реакции гладкой мышцы трахеи на гистамин. Рос. Физиол. журн. им. И.М.Сеченова. 83 (7) : 102-108, 1997.
37. Федин А.Н., Кузубова Н.А., Данилов Л.Н., Лебедева Е.С., Постникова Т.Ю., Кривченко А.И. Бронхолитический эффект преднизолона у крыс, ингалированных диоксидом азота. Рос. Физиол. Журн. Им. И.М. Сеченова.-2010.-т.96(3),-С.293-300.
38. Федин А.Н., Ноздрачев А.Д.. Медиаторы синаптической передачи в ганглиях трахеального сплетения. ДАН.-1995.- т.341(3),-С. 425-428
39. Федин А.Н., Постникова Т.Ю., Кирилина В.М., Кривченко А. И. Гетерогенность реакций дыхательных путей крысы на серотонин. Росс. Физиол. журн. им. И.М.Сеченова. – 2011. – Т.97, № 8. – С.862-869.
40. Федин) Fedin A.N., Kryukova E.N., Nekrasova E.A. Interaction of histamine and glucocorticoids with neural structures of the respiratory tract. Neurosci Behav Physiol. 33(3) : 289-294, 2003.
41. Шмидт Р., Тевс Г. Физиология человека. В 3-х томах. 2005 г. DJVU, 865 стр., 2005 г.
42. Kuzubova N., Lebedeva E., Fedin A. Change in dilation effect of prednisolone at the different stages of COPD. ERS Ann. Cong. – Amsterdam, 2011. – P1774.
43. Abdel Salam O.M.E., Bodis B., Karadi O., Szolcsanyi J., Mozin G. Modification of aspirin and ethanol-induced mucosal damage in rats by intragastric application of resiniferatexin. Inflammopharmacology, 1995, 3, 135-147
44. Adriaensen D., Brouns I., Pintelon I. et al. Evidence for a role of neuroepithelial bodies as complex airway sensors: comparison with smooth muscle-associated airway receptors. J. App. Physiol, 2006, Vol.101.-P.960-970
45. Allen C. Myers , Radhika Kajekar , Bradley J. Udem Allergic inflammation-induced neuropeptide production in rapidly adapting afferent nerves in guinea pig airways. American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular PhysiologyPublished, 2002, Vol. 282no. 4,L775-L781
46. Alving K, Sundström C, Matran R, Panula P, Hökfelt T, Lundberg JM. Association between histamine-containing mast cells and sensory nerves in the

skin and airways of control and capsaicin-treated pigs. *Cell Tissue Res.* 1991;264(3):529-38.

47. Annaïg Ozier, Benoit Allard, Imane Bara, Pierre-Olivier Girodet, Thomas Trian, Roger Marthan, and Patrick Berger. The Pivotal Role of Airway Smooth Muscle in Asthma Pathophysiology/ *Journal of Allergy*. 2011; 188 (2): 20 – 24

48. Anvari F, Sharma AK, Fernandez LG . Tissue-derived proinflammatory effect of adenosine A2B receptor in lung ischemia-reperfusion injury. *Thorac Cardiovasc Surg*, 2010, vol.140, no 4, pp 871-877

49. Armour CL, Johnson PR, Marthan R, Black JL. Prostaglandin F2 alpha augments the response to parasympathetic fibre stimulation in an isolated innervated preparation of rabbit trachea. *J Auton Pharmacol*. 1988; 8(3):251-8.

50. Auchampach J.A., Gross G.J. Adenosine A1 receptors, KATP channels, and ischemic preconditioning in dogs. *Am. J. Physiol.*, 2005; pp. 264.

51. Barnes P.J. Airway epithelial receptors. *Eur Respir Rev.* - 1994. - 4: 23. P.371-379

52. Baraldi P.G., Cacciari B., Merighi S. et al. A(3) adenosine receptor ligands: history and perspectives. *Med. Res. Rev.*, 2000; pp. 20

53. Barbara G, Wang B, Stanghellini V, de Giorgio R, Cremon C, Di Nardo G, Trevisani M, Campi B, Geppetti P, Tonini M, Bunnett NW, Grundy D, Corinaldesi R. Mast cell-dependent excitation of visceral-nociceptive sensory neurons in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 132: 26–37, 2007.

54. Barnes P.J. Neurogenic inflammation and asthma. *J.Asthma.*- 1992: 29; 3; 165-180

55. Barnes P.J., Chung K. F., Page C.P. Inflammatory mediators of asthma: an update. *Pharmacol. Rev.* 1998;50:515–596.

56. Bayer H., Müller T., Myrtek D., Sorichter S., Ziegenhagen M., Norgauer J., Zissel G. and Idzko M.. Serotonergic Receptors on Human Airway Epithelial Cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. Vol. 36, pp. 85-93, 2007.

57. Begueret H., Berger P., Vernejoux J. M., Dubuisson L., Marthan R., and Tunon-De-Lara J. M. Inflammation of bronchial smooth muscle in allergic asthma. *Thorax*, 2007; vol. 62, no. 1, pp. 8–15.

58. Belmonte K.E. Cholinergic Pathways in the Lungs and Anticholinergic Therapy for Chronic Obstructive Pulmonary Disease //Proc. Am. Thorac. Soc.-2005.-Vol. 2.-P.297-304.

59. Belvisi M.G., Miura M., Stretton D.J. Endogenous vasoactive intestinal peptide and nitric oxide modulate cholinergic neurotransmission in guinea-pig trachea //Eur. J. Pharmacol.-1993.-Vol.231(1).-P.97-102.
60. Bradding P, Walls AF, Holgate ST. The role of the mast cell in the pathophysiology of asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2006; 117(6):1277-84.
61. Brightling CE, Symon FA, Holgate ST, Wardlaw AJ, Pavord ID, Bradding P. Interleukin-4 and -13 expression is co-localized to mast cells within the airway smooth muscle in asthma. *Clin Exp Allergy.* 2003; 33(12):1711-6.
62. Brouns I., Genechten J., Hayashi H., et al. Dual Sensory Innervation of Pulmonary Neuroepithelial Bodies. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology.*-2003.-Vol.28.-P.275-285.
63. Brown R., Ollerstam A., Johansson B. et al. Abolished tubuloglomerular feedback and increased plasma rennin in adenosine A1 receptordeficient mice. *Am. J. Physiol.*, 1998; vol 281, pp. 1362-1367.
64. Canning B.J. Neurokinin3 receptor regulation of the airways. *Vascul. Pharmacol.* 2006.-Vol.45(4).-P. 227-234.
65. Carr MJ, Udem BJ. Inflammation-induced plasticity of the afferent innervation of the airways. *Environ Health Perspect* 109, 2001, Suppl 4: 567–571.
66. Caughey G. H., Lazarus S. C., Viro N. F., Gold W. M., Nadel J. A Tryptase and chymase: comparison of extraction and release in two dog mastocytoma lines. *Immunology*, 1988; 63: 339-344.
67. Caughey G. H., Leidig F., Viro N. F., Nadel J. A. Substance P and vasoactive intestinal peptide degradation by mast cell tryptase and chymase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1988; 244: 133-137.
68. Caughey G. H. , George H. Roles of mast cell tryptase and chymase in airway function. *Am. J. Physiol.* 1989; 257: 39-46.
69. Christopher E. Brightling, M.B., B.S., Peter Bradding, D.M., Fiona A. Symon, Ph.D., Stephen T. Holgate, M.D., D.Sc., Andrew J. Wardlaw, Ph.D., and Ian D. Pavord, D.M. Mast cell Infiltration of Airway Smooth Muscle in Asthma. *N Engl J Med* 2002; 346:1699-1705
70. Chuaychoo B, Lee MG, Kollarik M, Pullmann RJr, Udem BJ Evidence for both adenosine A1 and A2A receptors activating single vagal sensory C-fibres in guinea pig lungs. *J Physiol.* 2006 Sep 1;575(Pt 2):481-90.
71. Colasurdo G.N., Loader J.E.; Graves J.P. et al. Modulation of acetylcholine release in rabbit airways in vitro. *Am. J. Physiol.*-1995.-Vol.268(3 Pt 1).-P.432-437.

72. Coulson F.R., Fryer A.D. Muscarinic acetylcholine receptors and airway diseases. *Pharmacol. Ther.*-2003.-Vol.98(1).-P.59-69
73. Crivellato E., Travan L., Ribatti D. Mast cell and basophils: a potential link in promoting angiogenesis during allergic inflammation. *Int. Arch Allergy Immunol*, 2010; 151: 89-97
74. Cronstein BN, Levin RI, Phillips NI, Hirschhorn R, Abramson SB, Weissman G. Neutrophil adherence to endothelium is enhanced via adenosine A<sub>1</sub> receptors and inhibited via adenosine A<sub>2</sub> receptors. *J Immunol*, 1992;148: 2201–2206.
75. De Boer WI, van Schadewijk A., Sont JK, Sharma HS, Stolk J, Hiemstra PS, van Krieken JH, Transforming growth factor beta-1 and recruitment of macrophages and mast cells in airways in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1988; 158(6):1951 – 7.
76. De Lima WT, da Silva ZL. Contractile responses of proximal and distal trachea segments isolated from rats subjected to immunological stimulation: role of connective tissue mast cell. *Gen Pharmacol.*, 1988; vol 30 (5), pp. 689. – 95.
77. Dey R.D., Altemus J.B., Rodd A. et al. Neurochemical characterization of intrinsic neurons in ferret tracheal plexus. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*-1996.-Vol.14(3).-P.207-216.
78. Donnerer J., Amann R. Capsaicin-evoked neuropeptide release is not dependent on membrane potential changes. *Neurosci. Lett*, 1990, 117, 331-334
79. Dunford PJ, O'Donnell N, Riley JP, Williams KN, Karlsson L, Thurmond RL. The histamine H<sub>4</sub> receptor mediates allergic airway inflammation by regulating the activation of CD4<sup>+</sup> T cells. *J Immunol*. 2006 Jun 1;176(11):7062-70.
80. Dunwiddia T.V., Fredholm B.B. Adenosine neuromodulation. *Purinergic Approaches in Experimental Therapeutics*, 1997, pp. 359 - 382,
81. Dürk T, E Panther, T Müller, S Sorichter, D Ferrari, C Pizzirani, F Di Virgilio, D Myrtek, J Norgauer and M Idzko. 5-Hydroxytryptamine modulates cytokine and chemokine production in LPS-primed human monocytes via stimulation of different 5-HTR subtypes. *International Immunology*, 2005 17(5):599-606.
82. Elekes K, Helyes Z, Németh J, Sándor K, Pozsgai G, Kereskai L, Börzsei R, Pintér E, Szabó A, Szolcsányi J. Role of capsaicin-sensitive afferents and sensory neuropeptides in endotoxin-induced airway inflammation and consequent bronchial hyperreactivity in the mouse. *Regul Pept*. 2007, 7;141(1-3):44-54.



83. Feoktistov I, Biaggioni I. Pharmacological characterization of adenosine A<sub>2B</sub> receptors. Studies in human mast cells co-expressing A<sub>2A</sub> and A<sub>2B</sub> adenosine receptor subtypes. *Biochem Pharmacol* 1998;55:627–633.
84. Feoktistov I, Polosa R, Holgate ST, Biaggioni I. Adenosine A<sub>2B</sub> receptors: a novel therapeutic target in asthma. *Trends Pharmacol Sci* 1998;19:148–153.
85. Ferre S., Popoli P., GimenezLlort L. et al. Postsynaptic antagonistic interaction between adenosine A1 and dopamine D1 receptors. *Neuroreport*, 1994, no 6, pp. 73 - 76,
86. Franconi G, Graf P. D., Lazarus S. C., Nadel J. A., Caughey G. H. Mast cell chymase and tryptase reverse airway smooth muscle relaxation induced by vasoactive intestinal peptide in the ferret. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 248: 947-951, 1989.
87. Holzer P. Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *The Regulatory Peptide Lett.*, 1991, v. 43, N2, 143-201
88. Holzer P. Neural emergency system in the stomach: peptidergic neurons signal for protective hyperemia. *The Regulatory Peptide Lett.*, 1992, v. IV, N3, 48-51
89. Holzer P., Maggi C.A. Dissociation of dorsal root ganglion neurons into afferent and efferent-like neurons. *Neuroscience*, 1998, v. 86, N2, 389-398.
90. Hughes PJ, Holgate ST, Church MK. Adenosine inhibits and potentiates IgE dependent histamine release from human lung mast cells by an A<sub>2</sub>-purinoceptor mediated mechanism. *Biochem Pharmacol* 1984;33:3847–3852.
91. Ichinose M, Barnes PJ. Histamine H<sub>3</sub>-receptors modulate nonadrenergic noncholinergic neural bronchoconstriction in guinea-pig in vivo. *Eur J Pharmacol.* 1989, 12;174(1):49-55.
92. Ito A, Hagiyaama M, Oonuma J. Mast cell tryptase causes homologous desensitization of beta-adrenoreceptors by Ca<sup>2+</sup> sensitization in tracheal smooth muscle *J Smooth Muscle Res.* 2008;44(2):83-93.
93. Jacoby D B. Airway Neural Plasticity. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*-2003.-Vol.28.-P.138-141.
94. Johnson M. Beta2-adrenoceptors: mechanisms of action of beta2-agonists. *Pediatr. Respir. Rev.*-2001.-Vol. 2(1).-P.57-62.
95. Jolly S, Desmecht D. Functional identification of epithelial and smooth muscle histamine-dependent relaxing mechanisms in the bovine trachea, but not in bronchi. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2003, 134(1) : 91-100.
96. Jones N.L., Shabib S., Sherman P.M. Capsaicin as an inhibitor of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1997, 146, 223-227.

97. Joos GF, Lefebvre RA, Bullock GR, Pauwels RA. Role of 5-hydroxytryptamine and mast cells in the tachykinin-induced contraction of rat trachea in vitro. *Eur J Pharmacol*, 1997, 12;338(3):259-68.
98. Joos GF, Pauwels RA, van der Straeten ME. The mechanism of tachykinin-induced bronchoconstriction in the rat. *Am Rev Respir Dis*. 1988 May;137(5):1038-44.
99. Keir Sandra, Victoria Boswell-Smith, Domenico Spina, and Clive Page. Mechanism of adenosine-induced airways obstruction in allergic guinea pigs/ *Br J Pharmacol*, 2006; 147(7): 720–728.
100. Kiernan JA Degranulation of mast cells in the trachea and bronchi of the rat following stimulation of the vagus nerve. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1990;91(4):398-402
101. Kwong Kevin, Zhong-Xin Wu, Michael L. Kashon, Kristine M. Krajnak, Phyllis M. Wise, and Lu-Yuan Lee. Chronic smoking enhances tachykinin synthesis and airway responsiveness in guinea pigs. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2001; 25 (3), 299-305.
102. Leff AR, Stimler NP, Munoz NM, Shioya T, Tallet J, Dame C. Augmentation of respiratory mast cell secretion of histamine caused by vagus nerve stimulation during antigen challenge. *J Immunol*, 1986, 1;136(3):1066-73
103. Linden A. Eltzschig Y. K. Role of pulmonary adenosine during hypoxia: extracellular generation, signaling and metabolism by surface adenosine deaminase/CD26. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 2007, 7(9), pp. 1437-1447.
104. Loenders B, Jorens PG, Herman AG. Epithelial modulation of cholinergic responses in rabbit trachea is partly due to neutral endopeptidase activity. *Eur J Pharmacol*, 1996, 18;296(1):89-96
105. Maggi C.A., Tachykinins and CGRP as co-transmitters released from peripheral endings of sensory nerves. *Prog. Neurobiol.*, 1995, 45, 1-98
106. Maruno K., Absood A., Said S.I. VIP inhibits basal and histamine-stimulated proliferation of human airway smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.*-1995.-Vol.268(6).-P1047-1051.
107. Matsumoto S., Kanno T., Nagayama T. et al. H1- and H2-receptor influences of histamine and ammonia on rapidly adapting pulmonary stretch receptor activities. *Auton. Nerv. Syst.*-1993.-Vol.43(1).-P.17-25
108. Matsuzaki Y., Hamasaki Y.,I, Said S. I. Vasoactive intestinal peptide: a possible transmitter of nonadrenergic relaxation of guinea pig airways. *Science Wash*, 2010: Vol. 198O, pp. 1252-1253.

109. Moffatt J. D, T. M Cocks, and C. P Page. Role of the epithelium and acetylcholine in mediating the contraction to 5-hydroxytryptamine in the mouse isolated trachea. *Br J Pharmacol.* 2004; 141(7): 1159–1166.
110. Moiseeva EP, Straatman KR, Leyland ML, Bradding P. CADM1 controls actin cytoskeleton assembly and regulates extracellular matrix adhesion in human mast cells. *PLoS One.* 2014, 22;9(1).
111. Müller T, Myrtek D, Bayer H, Sorichter S, Schneider K, Zissel G, Norgauer J, Idzko M. Functional characterization of histamine receptor subtypes in a human bronchial epithelial cell. *Line. Int J Mol Med,* 2006, 18(5) : 925-931.
112. Mutoh T, Bonham AC, Joad JP. Substance P in the nucleus of the solitary tract augments bronchopulmonary C fiber reflex output. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp,* 2000, Vol. 1279:1215–1223.
113. Myers AC, Udem BJ, Weinreich D. Influence of antigen on membrane properties of guinea pig bronchial ganglion neurons. *J Appl Physiol,* 1991, 71: 970–976.
114. Myers AC, Udem BJ. Antigen depolarizes guinea pig bronchial parasympathetic ganglion neurons by activation of histamine H1 receptors. *Am J Physiol.* 1995;268(6 Pt 1): pp.879-84.
115. Peachell PT, Lichtenstein LM, Scheimer RP. Regulation of human basophil and lung mast cell function by adenosine. *J Pharmacol Exp Ther*1991;256:717–726.
116. Pollack G. A. *Muscles and Molecules.* Seattle: Ebner and Sons Publ., 1990, p. 300.
117. Polosa R. Adenosine-receptor subtypes: their relevance to adenosine-mediated responses in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *ERS Journals Ltd,* 2002; 20(2):488–96.
118. Reynolds P.N., Holmes M.D., Scicchitano R. Role of tachykinins in bronchial hyper-responsiveness. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol.-1997.-24(3-4).-P.273-280.*
119. Reynolds S. M., R. Docherty, J. Robbins, D. Spina, and C. P. Page. Adenosine induces a cholinergic tracheal reflex contraction in guinea pigs in vivo via an adenosine A<sub>1</sub> receptor-dependent mechanism. *J Appl Physiol* 105: 187-196, 2008.
120. Riccio MM, Myers AC, Udem BJ. Immunomodulation of afferent neurons in guinea-pig isolated airway. *J Physiol,* 1996, 491: 499–509.
121. Said S. I. Influence of neuropeptides on airway smooth muscle. *Am. Rev. Respir. Dis.,* 1987, 136: pp. 52-58.

122. Santos A.F, Novalbos J, Gallego S.S. et al. Regulation of bronchial tone in chronic obstructive pulmonary disease (COPD): role of muscarinic receptors. *An.Med.Interna.*-2003.-Vol.20(4).-P.201-205
123. Sears M.R. et al. Relation between Airway Responsiveness and IgE in Children with Asthma and in Apparently Normal Children. *N Engl J Med*, 1991, Vol. 325, P. 1067-1071.
124. Sekizawa K. J., Tamaoki S. C., Lazarus P. D., Graf M. R., Northfield W. M., Gold D J. Interactions between mast cell-derived mediators and dog bronchial smooth muscle. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1987, 135: A271.
125. Shaoyong Yu, Marian Kollarik, Ann Ouyang, Allen C. Myers, and Bradley J. Undem. Mast cell-mediated long-lasting increases in excitability of vagal C fibers in guinea pig esophagus. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007, 293: pp.850-856.
126. Stead RH, Dixon MF, Bramwell NH, Riddell RH, Bienenstock J. Mast cells are closely apposed to nerves in the human gastrointestinal mucosa. *Gastroenterology*, 1989, 97: 575–585,.
127. Stephens N.L., Kroegan E.A., Kremer U. Induction of a myogenic response in tracheal airway smooth muscle by tetraethylammonium. *Am. J. Physiol.*-1975.-Vol.228,No 2.-P.628-632
128. Suzuki H, Takei M, Nakahata T, Fukamachi H. Inhibitory effect of adenosine on degranulation of human cultured mast cells upon cross-linking of FcεRI. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;242:697–702.
129. Szallasi A., Blumberg P.M. Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol. Rev.*, 1999, v. 51, N2, 159-211.
130. Tamaoki J., Kondo M., Takemura H. et al. Continuous monitoring of nitric oxide release from airway mucosa. *Nippon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi.*-1994.-Vol.32(12).-P.1164-1169
131. Undem B., Kollarik M. The Role of Vagal Afferent Nerves in Chronic Obstructive Pulmonary *Disease*. *The Proceedings of the American Thoracic Society*, 2005, vol.2, pp.355-360
132. Undem BJ, Kajejar R, Hunter DD, Myers AC. Neural integration and allergic disease. *J Allergy Clin Immunol*, 2000,106: pp. 213–220,
133. Undem BJ, Riccio MM, Weinreich D, Ellis JL, Myers AC Neurophysiology of mast cell-nerve interactions in the airways. *Int Arch Allergy Immunol*, 1995;107(1-3):199-201.

134. Varani K., Caramori G., Vincenzi F., Adcock I. Alteration of adenosine receptors in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 2006; vol.173, pp. 398–406.
135. Vass G., Horváth I. Adenosine and adenosine receptors in the pathomechanism and treatment of respiratory diseases. *Curr Med Chem*, 2008, vol.15, no 9, pp. 917-922.
136. Vlahos R., M. E. Fabiani & D. F. Story. Influence of the epithelium on acetylcholine release from parasympathetic nerves of the rat trachea. *Journal of Autonomic Pharmacology*, 2000, 20, 237-251
137. Walker BA, Jacobson MA, Knight DA, *et al.* Adenosine A<sub>3</sub> receptor expression and function in eosinophils. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1997;16:531–537.
138. Winchilli V.M., Elswick R.K. The multivariate assessment of distributions. *J. Royal. Stat.*, 2007, vol. 7, no1, pp. 444-460.
139. Wood JD. Enteric neuroimmunophysiology and pathophysiology. *Gastroenterology*, 2004, 127: 635–657.
140. Yu M, Wang Z, Robinson NE. Prejunctional alpha 2-adrenoceptors inhibit acetylcholine release from cholinergic nerves in equine airways. *Am. J. Physiol.*-1993.-Vol.265.-P.565-570.
141. Zhong H., Belardinelli L., Maa T., Zeng D. Synergy between A2B adenosine receptors and hypoxia in activating human lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol.*, 2005, vol. 32, pp. 2–8.
142. Zhou Y., Schneider D. J., Blackburn M. R. Adenosine signaling and the regulation of chronic lung disease. *Pharmacol Ther*, 2009, vol.123, no 1, pp. 105–116.
143. Zhu W., Dey R.D. Projections and Pathways of VIP- and nNos-Containing Airway Neurons in Ferret Trachea. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol* .-2001.-Vol.24(1).-P.38-43

