

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УНИТАРНОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ
«НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ГИГИЕНЫ,
ПРОФПАТОЛОГИИ И ЭКОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА» ФЕДЕРАЛЬНОГО МЕДИКО-
БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНСТВА РОССИИ

На правах рукописи

НЕЧАЙКИНА ОЛЬГА ВАЛЕРЬЕВНА
ДЕЙСТВИЕ ЭНДОГЕННЫХ ОПИОИДОВ НА СОКРАТИТЕЛЬНУЮ
ФУНКЦИЮ ЛИМФАТИЧЕСКИХ СОСУДОВ

1.5.5 – физиология человека и животных

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
кандидат медицинских наук,
доцент Петунов С.Г.

Санкт-Петербург – 2024

Оглавление	
ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. СТРОЕНИЕ И ФУНКЦИИ ЛИМФАТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ. ЭНДОГЕННАЯ ОПИОИДНАЯ СИСТЕМА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	14
1.1. Лимфатическая система. Структурно-функциональные элементы.	14
1.1.1. Функции лимфатической сосудистой системы.....	21
1.1.2. Электрофизиологические свойства лимфатических сосудов.....	27
1.1.3. Сократительная активность лимфатических сосудов. Ее виды и значение.	30
1.2. Эндогенная опиоидная система. Структура и функции в организме.	41
1.2.1. Механизмы действия опиоидных пептидов	46
1.2.2. Эндоморфины – эндогенные агонисты μ -опиоидных рецепторов	49
1.2.3. Динорфины – эндогенные неселективные агонисты опиоидных рецепторов	51
1.2.4. β -эндорфин – эндогенный неселективный агонист опиоидных рецепторов	53
1.2.5. Роль опиоидной системы в деятельности сердечно-сосудистой системы	54
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	57
2.1 Выбор объекта исследования.....	57
2.2 Приготовление препаратов для исследования	57
2.3 Солевые растворы: состав, температура, оксигенация, рН	58
2.4 Фармакологические препараты, используемые для воздействия на сегменты лимфатических сосудов.....	60
2.5 Регистрация сократительной активности	61
2.6 Методика тренировки животных на тредбане	64
2.7 Характеристика экспериментального материала, объем исследований и статистическая обработка результатов	65
ГЛАВА 3. ВЫЯВЛЕНИЕ ОПИОИДНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В ЛИМФАТИЧЕСКИХ СОСУДАХ С ПОМОЩЬЮ СИНТЕТИЧЕСКИХ АГОНИСТОВ ОПИОИДНЫХ ПЕПТИДОВ	67
3.1 Сократительная активность лимфатических сосудов при действии селективного агониста μ -OP DAMGO	69
3.2 Сократительная активность лимфатических сосудов при действии селективного агониста δ -OP DADLE	70

3.3 Сократительная активность лимфатических сосудов при действии селективного агониста κ-ОР U-69593	71
3.4 Обсуждение результатов	72
ГЛАВА 4. ВЛИЯНИЕ ЭНДОГЕННЫХ ОПИОИДОВ НА СОКРАТИТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ЛИМФАТИЧЕСКИХ СОСУДОВ	78
4.1. Сократительная активность лимфатических сосудов при действии β-эндорфина	79
4.1.1. Изучение механизмов действия β-эндорфина на лимфатические сосуды крысы.	80
4.1.2. Обсуждение результатов	91
4.2. Сократительная активность лимфатических сосудов при действии эндоморфина-1	93
4.2.1. Изучение механизмов действия эндоморфина-1 на лимфатические сосуды крысы.....	94
4.2.2. Обсуждение результатов	101
4.3. Сократительная активность лимфатических сосудов при действии динорфина А	103
4.3.1. Изучение механизмов действия динорфина А на лимфатические сосуды крысы.....	104
4.3.2. Обсуждение результатов	109
ГЛАВА 5. ИЗМЕНЕНИЕ СОКРАТИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ЛИМФАТИЧЕСКИХ СОСУДОВ ПОСЛЕ РЕГУЛЯРНЫХ ФИЗИЧЕСКИХ НАГРУЗОК И НА ФОНЕ ВЛИЯНИЯ β-ЭНДОРФИНА	112
5.1 Сократительная активность лимфатических сосудов тренированных крыс при действии β-эндорфина	114
5.2 Изучение механизмов действия β-эндорфина на лимфатические сосуды крыс, подвергавшихся регулярной физической нагрузке	116
5.3 Обсуждение результатов	119
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	126
ВЫВОДЫ	140
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	142
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	144

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Лимфатическая система, частью которой является сеть специализированных лимфатических сосудов, выполняет в организме ряд важных функций, таких как участие в поддержании гомеостаза, транспорт ультрафильтрата и электролитов из интерстиция в системную циркуляцию, резорбция липидов и олигопептидов, а также участие в обеспечении иммунной защиты. Лимфа образуется из тканевой жидкости, которая поступает в слепой конец лимфатического сосуда под влиянием градиентов гидростатического и онкотического давлений. Перемещение лимфы в просвете лимфатического сосуда происходит против градиента гидростатического давления, поскольку эта величина в грудном протоке существенно превышает внутрисосудистое давление в периферических коллекторах [39]. Движение лимфы в лимфатической системе создают так называемые внутренние механизмы (величина объемного лимфообразования, сократительная активность лимфатических сосудов и лимфатических узлов) и внешние механизмы (сокращения сердечной мышцы, гладкой мускулатуры кровеносных сосудов, скелетной мускулатуры, колебания внутригрудного или внутрибрюшного давления, перистальтика органов желудочно-кишечного тракта, влияние гравитации), нередко обозначаемые термином «лимфатическая помпа» («the lymph pump») [30, 32, 33, 68, 130, 131]. В отличие от системы кровообращения, в которой центральным насосом является сердце, движение лимфы осуществляется за счет работы лимфангионов – отдельных сегментов лимфатических сосудов (ЛС), ограниченных клапанами и содержащих в стенке гладкомышечные клетки (ГМК) [39]. Обладая способностью к спонтанной сократительной активности, лимфангионы обеспечивают перемещение своего содержимого в соседний (проксимальный) сегмент в циклическом режиме. Сократительная деятельность ЛС имеет три уровня регуляции. Первый уровень представлен ауторегуляцией ритма и силы сокращений ЛС в зависимости от уровня эндолимфатического давления. Этим обеспечивается соответствие между

объемом наполнения лимфангиона в диастолу и выбросом в систолу и, следовательно, между уровнем лимфообразования и ее активного транспорта. Второй уровень регуляции осуществляется местными нервными и гуморальными механизмами, которые изменяют насосную и емкостную функции ЛС в соответствии с функциональным состоянием региона и уровнем лимфообразования в нем. Третий уровень регуляции представлен центральными нервными и гормональными влияниями, которые модулируют интенсивность активного транспорта лимфы в зависимости от потребностей всего организма. За счет этих механизмов реализуется участие лимфатической системы в реакции организма на стрессорное воздействие: при снижении объема циркулирующей крови и АД при кровопотере, когда компенсаторно происходит «сброс» лимфы в кровеносную систему, в процессе мышечной работы, при беременности. Увеличение лимфообразования, стимулирующее активный транспорт лимфы, происходит также при венозной недостаточности и воспалении, что предотвращает образование отеков [5].

Одно из весомых мест в регуляции сократительной активности ЛС принадлежит регуляторным пептидам. Выделяясь из синаптического окончания и действуя на одну постсинаптическую клетку, они выполняют функцию медиатора; оказывая влияние на небольшое число клеток, окружающих родительскую молекулу, они служат модуляторами; достигая отдаленных участков организма, они работают как гормоны. Таким образом, один и тот же пептид может выступать во всех трех ролях. Одной из наиболее характерных черт регуляторных пептидов является их полифункциональность, когда один и тот же пептид может модулировать работу многих систем организма. А их фрагменты, образуемые при ферментативном распаде, могут обладать собственной физиологической активностью [24]. К регуляторным пептидам относятся эндогенные опиоидные пептиды (ОП), которым присущи все вышперечисленные свойства.

Влияние класса эндогенных опиоидов (энкефалинов) и их синтетических аналогов (даларгина) на сократительную активность лимфатических сосудов

несистемно изучалось отечественными учеными в 80-90-х годах прошлого века [15, 53, 54]. В современной литературе описаны результаты стимулирующего влияния синтетического опиоидного пептида (ОП-171, аналог лей-энкефалина и даларгина, агонист δ -опиоидных рецепторов) на лимфоток при острой тонкокишечной непроходимости и при остром отеке легких [49, 50]. Однако механизмы их действия на лимфатические сосуды не изучались. При этом, эндогенные опиоиды, попадая в системный кровоток посредством абсорбции в лимфатические капилляры из интерстиция и транспортируясь по лимфатическим сосудам, выполняют ряд регуляторных функций, модулируя активный транспорт лимфы, что предопределило обоснованность углубленного изучения их влияния на сократительную активность лимфангионов, в том числе механизмов действия ОП на лимфатические сосуды.

Степень разработанности темы исследования

Изучению функций лимфатической системы посвящено достаточно научных исследований, так же, как и изучению регуляции сократительной активности [6, 7, 12, 30, 32, 33, 43, 84, 127, 192, 283, 293]. Значимое место в регуляторных процессах лимфодинамики отводится гуморальным факторам. В ряду последних существенная роль принадлежит эндогенным ОП, однако механизмы их действия на лимфангионы изучены недостаточно. За относительно продолжительный период изучения эндогенная опиоидная система (ЭОС), а это порядка пятидесяти лет, наряду с анальгетической функцией ОП, установлен ряд других функций, которые позволили отнести ЭОС к стресс-лимитирующим системам. Так, показано протективное действие ОП на систему кровообращения, в частности, при ишемически-реперфузионных повреждениях миокарда, когда продемонстрировано уменьшение очага поражения сердечной мышцы [79]. Изменяя уровень гормонов стресса, ЭОС выступает в качестве модулятора гормональной системы [29]. Обнаруженные антиязерогенный и нейропротекторный эффекты опиоидов, также позволяют отнести ЭОС к стресс-

лимитирующим системам [114, 244]. Наряду с доминирующими классическими представлениями о реакциях организма на стрессовую нагрузку, в которых ведущая роль отводится стресс-опосредованному влиянию симпатoadренальной системы, увеличивается количество информации о роли стресс-лимитирующих механизмов, к числу которых относится влияние ЭОС [29, 38, 55]. Роль эндогенных опиоидов в сосудистых реакциях, в том числе на ЛС, вызванных воздействием стрессорных факторов, к настоящему времени не установлена. Это послужило основанием для углубленного изучения влияния эндогенных ОП и их механизмов действия на ЛС в состоянии покоя и в условиях стресса, и определило цель и задачи данного исследования.

Цель исследования

Изучить сократительную функцию лимфатических сосудов при действии эндогенных опиоидов, механизмы их действия на лимфангионы в норме и после воздействия стрессового фактора – интенсивной физической нагрузки.

Задачи исследования:

1. Определить наличие опиоидных рецепторов в брыжеечных ЛС крысы.
2. Изучить влияние эндогенных опиоидов (β -эндорфина, эндоморфина-1, динорфина А) на сократительную активность ЛС крысы.
3. Установить механизмы действия эндогенных опиоидов (β -эндорфина, эндоморфина-1, динорфина А) на брыжеечные ЛС крысы.
4. Изучить влияние β -эндорфина на сократительную активность ЛС после действия регулярных физических нагрузок. Установить механизмы действия β -эндорфина на брыжеечные ЛС тренированных животных.

Научная новизна исследования

В исследовании впервые с использованием селективных агонистов опиоидных рецепторов (ОР) получены данные, свидетельствующие о наличии ОР

в структуре брыжеечных ЛС крысы. Показано, что μ - и δ -агонисты оказывали угнетающее действие на сократительную активность лимфангионов, а κ -агонист стимулировал моторику ЛС.

Впервые установлено, что β -эндорфин оказывает ингибирующее влияние на сократительную активность ЛС, опосредованное периферическими μ - и δ -опиоидными рецепторами лимфангионов. Показано, что влияние β -эндорфина на ЛС реализуется посредством активации как потенциал-зависимых, так и АТФ-чувствительных K^+ -каналов, выявлен эндотелиальный NO-зависимый механизм действия.

Впервые продемонстрировано, что эндоморфин-1 оказывает стимулирующее влияние на сократительную активность ЛС. Этот эффект является налоксон-независимым и опосредуется нейрокининовыми-1 рецепторами. Реализация стимулирующего эффекта эндоморфина-1 на брыжеечные ЛС осуществляется при участии ионов Ca^{2+} внутриклеточных депо.

Впервые получено, что динорфин А оказывает стимулирующее влияние на моторику лимфангионов, которое опосредуется через периферические κ -ОР. Выявлено, что реализация стимулирующего эффекта динорфина А на ЛС осуществляется при рекрутировании Ca^{2+} из внутриклеточных хранилищ, при этом вклад инозитол-три-фосфатных рецепторов наиболее выражен.

Впервые выявлено разнонаправленное действие β -эндорфина на ЛС тренированных и нетренированных животных: в отличие от лимфангионов нетренированных животных, на сократительную активность ЛС тренированных животных опиоид оказывал стимулирующее влияние. Впервые установлено, что стимулирующий эффект β -эндорфина на лимфатические сосуды тренированных животных является налоксон-зависимым и реализуется через κ -ОР.

Для оценки насосной функции ЛС, был предложен новый методический подход с определением интегрального показателя сократительной активности лимфангионов – минутной производительности, который рассчитывался как «площадь под кривой» (AUC) на миограмме за единицу времени и наиболее адекватно отражал мощность сокращений.

Теоретическая и практическая значимость результатов исследования

Получены новые знания о присутствии ОР в структуре брыжеечных ЛС крысы. Результаты проведенных исследований позволили раскрыть механизмы угнетающего действия β -эндорфина, а также стимулирующего эффекта эндоморфина-1 и динорфина А на брыжеечные ЛС крысы. Изучена сократительная активность ЛС тренированных и нетренированных крыс. ЛС к β -эндорфину тренированных и нетренированных животных. Раскрыт механизм стимулирующего эффекта ОП при влиянии на ЛС тренированных животных. Полученные данные могут быть использованы в учебном процессе в рамках дисциплины нормальной и патологической физиологии, в экспериментальных исследованиях, изучающих модуляцию сократительной активности ЛС регуляторными пептидами в состоянии покоя и в условиях стресса, а также при разработке фармакологических препаратов, действие которых направлено на модуляцию деятельности стресс-реализующих и стресс-лимитирующих систем организма.

Методология и методы исследования

Методологической основой диссертационного исследования послужили работы отечественных и зарубежных физиологов, посвященные изучению ЭОС, в частности, изучению структуры и локализации в организме опиоидных рецепторов и многообразия функций, выполняющих опиоидными пептидами; а также труды лимфологов, посвященные вопросам регуляции сократительной активности ЛС и работы анатомов и патоморфологов, изучавших вопросы строения лимфатической системы.

В диссертационном исследовании применялись следующие экспериментальные методы:

– регистрация сократительной активности изолированных ЛС в изометрических условиях с использованием многоканального проволочного миографа Multi Wire Myograph System 610M (DMT, Дания);

– моделирование стрессовой ситуации экспериментальных животных, путем тренировки белых крыс на тредбане (PanLab, Испания), поскольку тренировки наиболее адекватно характеризуют подготовку к нагрузкам в зоне аэробной мощности.

Для оценки полученных результатов, применялись общенаучные методы, такие как анализ, обобщение, аналогия, синтез, моделирование, логический метод.

Положения, выносимые на защиту

1. В брыжеечных ЛС крысы определяются μ -, δ - и κ -ОР. Агонисты ОР активируют различные сигнальные механизмы, реализующие разнонаправленный биологический эффект.

2. Эндогенный ОП β -эндорфин оказывает ингибирующее, не зависящее от концентрации влияние на сократительную активность брыжеечных ЛС крысы, которое является налоксон-зависимым и реализуется через активацию μ - и δ -ОР. Угнетающее действие β -эндорфина осуществляется посредством активации потенциал-зависимых и АТФ-чувствительных K^+ -каналов, а также посредством эндотелий-(NO)-зависимого механизма.

3. Эндогенный ОП эндоморфин-1 оказывает не зависящее от дозы стимулирующее влияние на фазную активность брыжеечных ЛС крысы, которое является налоксон-независимым и связано с активацией нейрокининовых-1 рецепторов. Реализация стимулирующего эффекта эндоморфина-1 осуществляется за счет рекрутирования Ca^{2+} из внутриклеточных хранилищ посредством стимуляции рианодиновых и IP_3 -рецепторов.

4. Эндогенный ОП динорфин А стимулирует сократительную активность брыжеечных ЛС крысы. Данный эффект является налоксон-зависимым, реализуется посредством активации κ -ОР и рекрутирования Ca^{2+} из внутриклеточных хранилищ, при участии как рианодиновых, так и IP_3 -рецепторов.

5. β -эндорфин разнонаправленно влияет на моторику ЛС тренированных и нетренированных животных. Стимулирующий эффект эндогенного опиоида на ЛС тренированных животных является налоксон-зависимым и реализуется посредством к-ОР.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность изложенных в диссертации результатов обусловлена строгим соблюдением требований Руководства по содержанию и уходу за лабораторными животными, в том числе использованию в работе здоровых крыс, использованием расходных материалов и оборудования ведущих отечественных и зарубежных производителей, находящегося в исправном техническом состоянии, надлежащим и объективным ведением записей исследования. Достоверность научных положений и выводов в диссертации обеспечена применением комплекса взаимодополняющих методик, адекватных цели и задачам исследования, использованием большого объема фактического материала, его анализом, корректным применением методик эмпирического исследования и статистической обработки данных. В работу включены материалы собственных исследований за 2013-2023 г.г.

Материалы диссертации доложены и обсуждены на XXII съезде физиологического общества имени И.П Павлова (Волгоград, 2013), XXIII съезде физиологического общества им. И.П. Павлова (Воронеж, 2017), IV Съезде Лимфологов России «Эпоха возрождения» (Москва, 2017), VI международной научно-практической конференции по клинической лимфологии «ЛИМФА-2018» (Москва, 2018), XIV международной научно-практической конференции памяти академика Ю.И. Бородина «Лимфология: от фундаментальных исследований к медицинским технологиям» (Новосибирск, 2021), научно-практической конференции молодых научных работников «Гигиена, токсикология, экология и профпатология: современные пути решения актуальных проблем» (Санкт-Петербург, 2021), III Санкт-Петербургском лимфологическом форуме «Лимфология без границ — путь в 400 лет: спорные вопросы и нерешенные

проблемы, достижения и открытия» (Санкт-Петербург, 2022), XV научно-практической конференции с международным участием «Лимфология: от фундаментальных исследований к медицинским технологиям» имени академика Ю.И. Бородина (Новосибирск, 2023).

Личный вклад автора

Личное участие автора осуществлялось на всех этапах выполнения работы, включало определение объема, методов исследования, планирование и проведение исследований по всем разделам диссертации. Автором самостоятельно проведен поиск и анализ зарубежных и отечественных источников литературы, формулирование целей и задач. Автору принадлежит ведущая роль в проведении экспериментальных исследований на всех его этапах. При написании диссертационной работы автором лично выполнен сбор первичных данных, статистическая обработка, анализ и обобщение полученных результатов, формулировка выводов и практических рекомендаций, оформление рукописи. В публикациях, подготовленных в соавторстве, личный вклад соискателя составляет 75 %. Методическую помощь при получении экспериментального материала, представленного в диссертации, оказал коллектив лаборатории экспериментальной физиологии ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России под руководством к.б.н. Д.С. Лаптева.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 13 печатных научных работ: 3 статьи в изданиях из перечня Высшей аттестационной комиссии при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации, 1 статья – в научном рецензируемом журнале, 9 работ в сборниках научно-практических конференций.

Объем и структура работы

Диссертация изложена на 166 страницах машинописного текста, состоит из введения, шести глав (обзора литературы, описания материалов и методов исследования, трех глав с описанием собственных результатов, заключения), выводов и списка литературы из 297 источников (242 – иностранных, 55 – отечественных). Диссертация иллюстрирована 27 таблицами и 35 рисунками.

ГЛАВА 1. СТРОЕНИЕ И ФУНКЦИИ ЛИМФАТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ. ЭНДОГЕННАЯ ОПИОИДНАЯ СИСТЕМА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. Лимфатическая система. Структурно-функциональные элементы.

Лимфатическая система млекопитающих является специализированной частью лимфоидной и сосудистой систем, играющей ключевую роль в обеспечении постоянства коллоидно-осмотического и гидростатического давления в интерстиции, обеспечении иммунной защиты организма [162, 175, 294]. Структурно-функциональные особенности лимфатического сосудистого русла обеспечивает однонаправленный ток лимфы, содержащей тканевые метаболиты, белки, липопротеины, из интерстициального пространства в системный кровоток.

Лимфатическая система является активным участником основных физиологических и патофизиологических процессов. Дисфункция лимфатических сосудов, до недавнего времени ассоциирующаяся преимущественно с лимфедемой и воспалением, выявлена при таких состояниях, как ожирение, гипертония, атеросклероз, болезнь Крона, а также при неврологических расстройствах, в частности, при болезни Альцгеймера [264].

Лимфатическую систему составляют лимфатические капилляры и посткапилляры, внутри- и внеорганные лимфоузлы, сеть лимфатических сосудов и коллекторов, сливающихся в лимфатические протоки, которые впадают в венозное русло в области левого и правого венозных углов (в месте слияния подключичных и внутренних яремных вен). Важными элементами лимфатической системы являются места развития лимфоцитов: вилочковая железа, лимфоидные образования слизистых оболочек, пульпа селезенки, лимфатические узлы. Лимфатические сосуды или лимфоидные структуры с функцией переноса жидкости и/или иммунных клеток были идентифицированы почти во всех органах, включая мозг и глаз [93, 251]. Функционирование составных элементов лимфатической системы обеспечивает процессы резорбции и транспорта лимфы,

играет ключевую роль в процессах иммунной защиты и метаболизме жирорастворимых веществ.

Лимфатические капилляры и посткапилляры

Образование лимфы связано с поступлением интерстициальной жидкости, содержащей высокомолекулярные органические вещества и клеточные компоненты, в инициальные, слепо начинающиеся лимфатические капилляры, которые, широко анастомозируя друг с другом, образуют капиллярную сеть [176] (Рисунок 1.1).

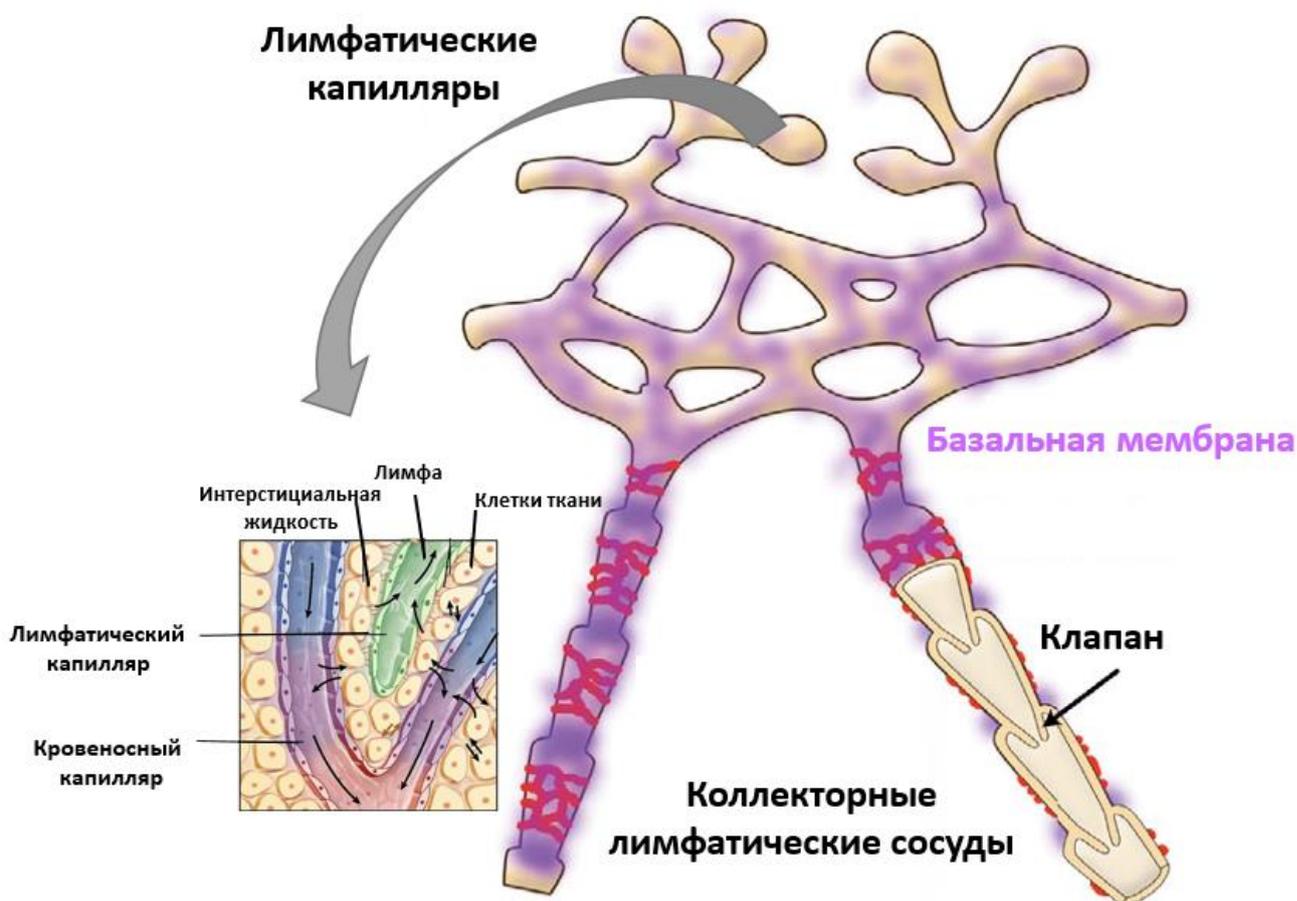


Рисунок 1.1 – Лимфатическая сосудистая сеть. Разработан автором

Строение лимфатической системы находится в сфере исследований морфологов уже на протяжении 100 лет. На Рисунке 1.2 представлена фотография подкожных лимфатических капилляров, датированная 1928 годом.

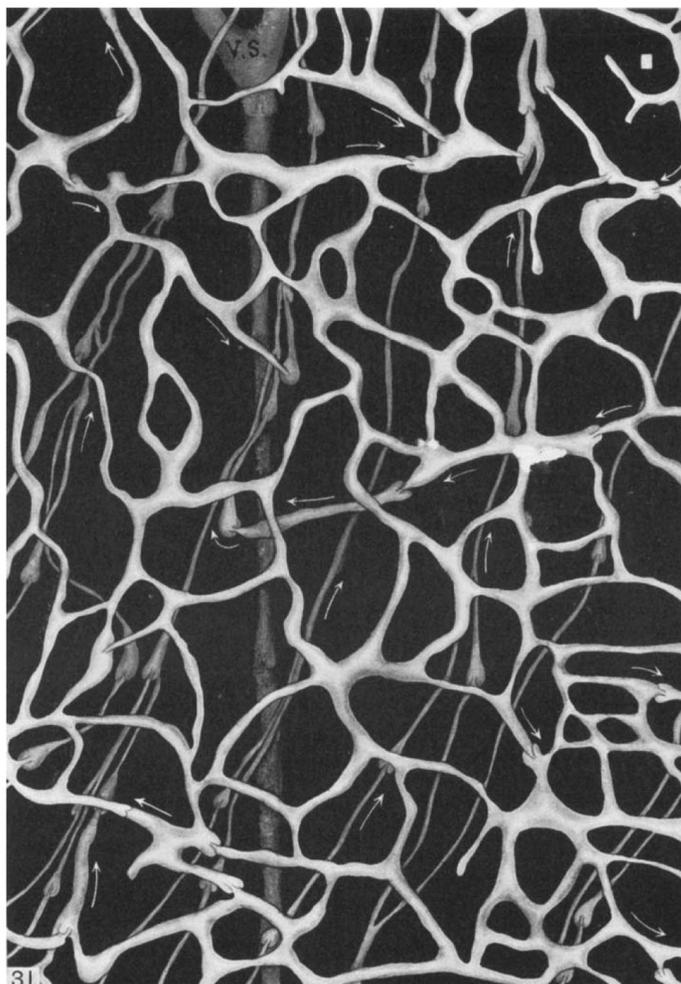


Рисунок 1.2 – Подкожные лимфатические капилляры и более глубокие собирательные лимфатические сосуды ножек человеческого плода длиной 130 мм (4,3 месяца) $\times 668$. Белый прямоугольник в верхнем углу указывает на естественный размер отображаемой области [165].

Стенка лимфатических капилляров образована монослоем уплощенных эндотелиальных клеток, которые имеют форму дубовых листьев, перекрывающих друг друга [69]. Эндотелиальные клетки соединены друг с другом посредством единичных «кнопочных контактов» (buttonlike junction), образованных сосудистым эндотелиальным VE-кадгерином и белками плотных контактов. Несвязанные створки эндотелиальных клеток образуют первичную клапанную

систему, которая при повышении интерстициального давления приводит к их открытию и формированию пор диаметром 2 - 3 мкм, позволяющих интерстициальной жидкости, содержащей иммунные клетки, белки, липопротеины, хиломикроны, проникать в просвет сосуда. При снижении уровня лимфообразования первичные клапаны смыкаются, предотвращая тем самым движение лимфы из капилляра в интерстиций (в обратном направлении, или ретроградно) [232]. Работа этих клапанов поддерживается закрепляющими филаментами, коллагеновыми фибриллами, которые связывают поверхность эндотелиальных створок с эластиновыми волокнами в интерстиции, и в условиях низкого лимфообразования препятствуют спадению лимфатических капилляров [134, 176].

Следующим звеном лимфатического русла условно можно считать посткапилляры, которые отличаются от лимфатических капилляров наличием прерывистой базальной мембраны и складчатыми эндотелиальными элементами в сосудистой стенке [21]. Из посткапилляров лимфа поступает в лимфатические сосуды.

Лимфатические сосуды и узлы

Лимфатические капилляры и посткапилляры освобождают свое содержимое в коллекторные (собирающие) лимфатические сосуды (ЛС), стенка которых представляет собой монослой эндотелиальных клеток, плотно соединенных контактами по типу «застежки-молнии» (zipper-like), расположенных на непрерывной базальной мембране [129]. Плотные межклеточные контакты и базальная мембрана предотвращают выход жидкой части лимфы за пределы сосудистого русла. В мелких ЛС появляются единичные гладкомышечные клетки (ГМК), наличие которых является морфологической основой сократительной активности ЛС. По мере укрупнения сосудов количество ГМК увеличивается, они формируют пучки, а в более крупных сосудах – слои ГМК, что обеспечивает возможность генерации синхронизированного сокращения сегмента ЛС.

Количество и плотность гладкомышечных волокон и их слоев (от одного до трех) в стенке сосуда определяются его калибром, локализацией в организме, а также заметно варьируют в зависимости от вида животного. Например, хорошо развитая гладкая мускулатура в шейных ЛС является приспособлением для преодоления препятствий к оттоку в венозное русло, возникающих при колебаниях давления в плечеголовных венах [39]. Установлены также возрастные изменения ГМК: плотность мышечных слоев и количество миоцитов в стенке ЛС уменьшаются от зрелого к старческому возрасту [39, 174]. В адвентиции представлены элементы соединительной ткани (фибробласты), эластические и коллагеновые волокна, а также аксоны, иннервирующие сосуды.

Важной морфофункциональной особенностью коллекторных ЛС, стволов и протоков является характерное «четкообразное» строение в виде чередующихся, неравномерно распределенных по длине сосуда участков расширений и сужений (Рисунок 1.3).

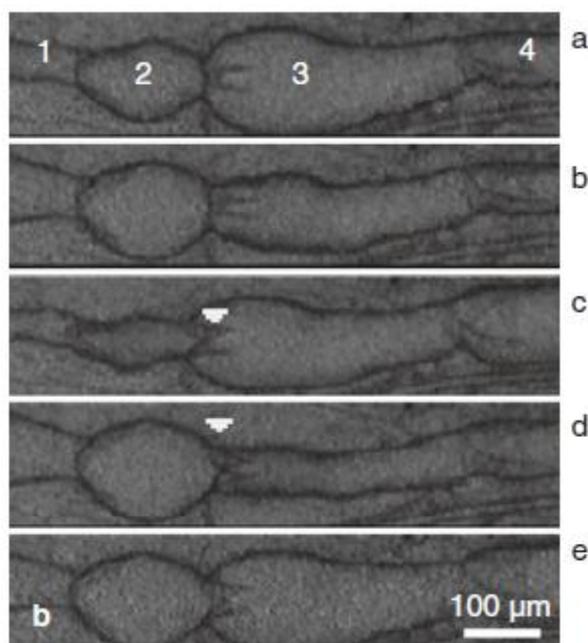


Рисунок 1.3 – Изображения лимфатического сосуда с последовательными сокращениями четырех лимфатических камер (1–4). Между камерами 2 и 3 виден однонаправленный клапан (стрелка) [283]

В местах сужений сосудов локализуются клапаны, створки которых сформированы бислойом эндотелиальных клеток, базальные стороны которых

отделены внутренней поддерживающей внеклеточной матрицей, содержащей волокна эластина [212].

Э. Хорстманн (E. Horstmann) в 1951 году впервые обозначил функциональную единицу ЛС как систему дистального клапана и проксимальной мышечной манжетки, которая получила название «клапанного сегмента» [147]. Позднее Х. Мислин (H. Mislin) [186] дал новое название «клапанному сегменту» – «лимфангион», указав границу между соседними лимфангионами – основание клапана, который целиком входит в состав лимфангиона и образует его дистальную часть [187]. В настоящее время научным сообществом лимфологов лимфангион рассматривается как межклапанный сегмент ЛС с гладкими миоцитами в стенке, в состав которого входят оба его пограничных клапана, то есть клапан принадлежит обоим смежным лимфангионам, а граница проходит между аксиальным и париетальным секторами клапана [40]. Морфологические и функциональные особенности лимфангиона позволяют выделить в нем три участка. В средней части выделяется мышечная манжетка, содержащая главным образом значительное количество ГМК, формирующих слои, расположенные по крутой или пологой спирали [2]. Синхронное сокращение подобным образом расположенных ГМК обеспечивает быстрое и эффективное повышение давления в лимфангионе, что приводит к открытию проксимального клапана и перемещению части содержимого (лимфы) в соседний лимфангион.

Сократительная активность лимфангионов формируется в результате спонтанной кратковременной деполяризации (spontaneous transient depolarization, STD) миоцитов, при этом частота (от 3 до 25 сокращений в минуту) и амплитуда одиночных сокращений (от 0,1 до 20 мН) варьируют в зависимости от калибра сосудов, величины давления в них, а также вида животных и экспериментальных условий [2, 33, 42].

Второй участок лимфангиона – это его несокращающаяся или слабо сокращающаяся часть, расположенная над клапаном, содержащая небольшое количество мышечных элементов и непосредственно двустворчатый клапан, который состоит из истонченной безмышечной створки и клапанного валика

(место перехода створки в стенку лимфангиона) [40]. Основная функция данного участка – формирование преимущественно однонаправленного тока лимфы. Третья часть лимфангиона – это область клапанного синуса, представляющая собой расширение, расположенное проксимальнее клапана. Это наиболее тонкая часть стенки содержит единичные пучки ГМК, а также соединительнотканые белки (Рисунок 1.4). Данный участок лимфангиона выполняет резервуарную функцию, обеспечивая накопление лимфы в условиях отрицательного градиента давления между дистально и проксимально расположенными лимфангионами.

Таким образом, лимфатическое сосудистое русло представляет собой совокупность лимфангионов, которые объединяются в непрерывную цепь благодаря общим (пограничным) клапанам (полилимфангионная организация) [40] и обеспечивают перемещение лимфы в центрипетальном направлении от одного межклапанного сегмента к другому в условиях переменного градиента давления, формирующегося в каждом конкретном участке сосудистого русла.



Рисунок 1.4 – Схема лимфангиона, где 1 – область мышечной манжетки; 2 – участок прикрепления клапана; 3 – область клапанный синус [232]. Редакция автора

ЛС на своем протяжении прерываются лимфатическими узлами (ЛУ) [41], в структуре которых определяются эндотелиоциты, ГМК и скопления специализированных клеток (стромальных, миелоидных и лимфоидных). Морфологические особенности ЛУ обеспечивают реализацию множества их функций, к числу наиболее значимых из которых относят гемопоэтическую (образование В- и Т-лимфоцитов в лимфатической ткани коркового и мозгового вещества), иммунопоэтическую (образование плазматических клеток и выработка антител), барьерно-фильтрационную (задержка поступающих в кровь микроорганизмов, клеток злокачественных опухолей, токсинов, чужеродных белков) и резервуарную (депонирование лимфы), участие в перераспределении жидкости между кровью и лимфой как в норме, так и в условиях патологии.

1.1.1. Функции лимфатической сосудистой системы

Многообразные функции лимфатической системы, способствующие поддержанию гомеостаза организма, тесным образом связаны между собой. Основные из них могут быть обобщены и представлены в виде резорбтивной, транспортной и защитной (иммунной).

Резорбтивная функция лимфатической системы

Резорбтивная (дренажная) функция обеспечивается поступлением из тканей в инициальные капилляры избытка интерстициальной жидкости, образованной при фильтрации из кровеносного русла и представляющей собой коллоидный раствор белковых веществ, не всасывающихся обратно в кровеносные капилляры, в состав которого входят также липиды, продукты обмена веществ, инородные частицы, бактерии, фрагменты клеток, продукты переваривания жиров и другие крупные молекулы.

Объем внеклеточной жидкости поддерживается на относительно постоянном уровне, несмотря на ежедневные колебания содержания воды и солей в организме. Это в значительной степени зависит от контроля переноса солей и

жидкости через стенку капилляров и возврата жидкости в плазму. Решающим фактором потока жидкости через стенку капилляра являются силы Старлинга, определяющие транскапиллярный перенос веществ. Под влиянием коллоидно-осмотического давления жидкость удерживается в кровеносном капилляре, а общее гидростатическое давление стремится вывести жидкость в окружающие ткани. Таким образом поддерживается динамическое равновесие: объем фильтрующейся жидкости равен объему жидкости, который возвращается в венозную часть капилляра [14]. Однако, эффективное реабсорбционное давление (давление в венозном конце капилляра) несколько меньше, чем фильтрационное (в артериальном конце капилляра), в результате чего, лишь 90% объема реабсорбируется в венозном конце капилляра. Оставшиеся 10% абсорбируются в лимфатические капилляры и транспортируются в виде лимфы по ЛС [68, 134]. Таким образом, чем больше объем плазмы, отфильтрованной в интерстиций, тем большее количество жидкости транспортируется через ЛС обратно в кровоток. У человека в кровь через лимфатическую систему возвращается 8-12 литров интерстициальной жидкости в день [287]. Кроме того, ЛС ответственны за суточный возврат около 60% сосудистых белков, а также липидов и жирорастворимых витаминов, входящих в состав хиломикронов [134].

Транспортная функция лимфатической системы

Перемещение содержимого ЛС от инициальных капилляров в системную циркуляцию обеспечивается механизмами активного и пассивного транспорта.

Интерстициальная жидкость, содержащая белки, клеточные элементы и другие компоненты, попадает в просвет лимфатического капилляра по градиенту давления и благодаря наличию «откидных клапанов» (flap valve) инициальных капилляров, которые образуются свободно перекрывающимися краями лимфатических эндотелиальных клеток. Лимфатические капилляры соединяются с внеклеточным матриксом посредством закрепляющих (якорных) филаментов,

которые предотвращают спадение капилляров при увеличении интерстициального давления [232] (Рисунок 1.5).

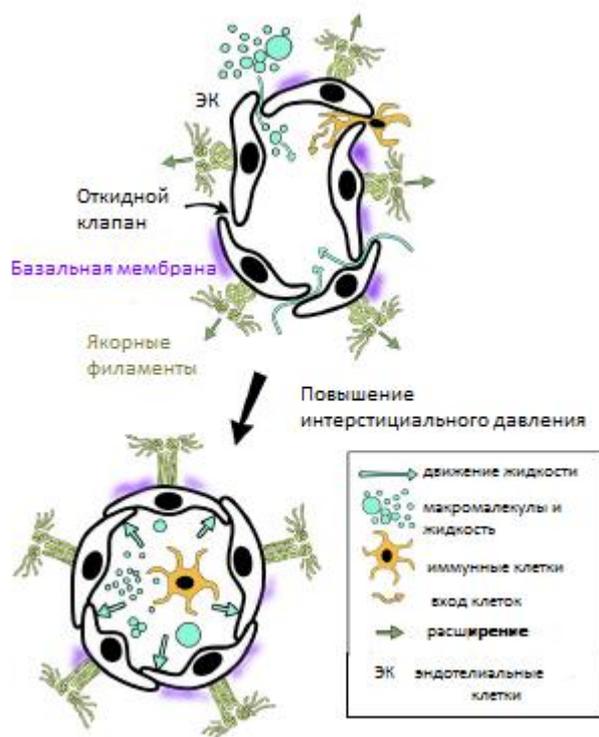


Рисунок 1.5 – Механизм формирования лимфы в капиллярах [232].
Редакция автора

Согласно имеющимся к настоящему времени представлениям, образование и перемещение лимфы в инициальных сосудах связано с действием нескольких сил, к числу которых относятся:

- сдавление лимфатических капилляров движением окружающих тканей, которое как бы выдавливает лимфу из начальных лимфатических сегментов в более крупные собирающие ЛС;
- сократительная активность ЛС, способствующая циклическому наполнению и освобождению лимфатических капилляров, и дальнейшему транспорту лимфы;
- циклически изменяющееся давление внутри лимфатических капилляров: при снижении давления до уровня, меньше, чем в интерстициальной

жидкости, возникает «всасывающая сила», способствующая заполнению капилляров [85].

Способность ЛС проявлять ритмические фазные сокращения известна как лимфатическая помпа, которая является одним из механизмов, посредством которого лимфатическая система выполняет транспортную функцию [294]. Сходные с сердечным циклом фазные сокращения сегментов ЛС обеспечивают перемещение лимфы против локального градиента давления, существующего между соседними лимфангионами [85]. Так, в начале сократительного цикла проксимальный и дистальный клапаны лимфангиона закрыты вследствие градиента давления, направленного против направления лимфотока. Синхронное сокращение ГМК приводит к быстрому подъему давления в просвете сегмента сосуда (систола), открытию проксимального клапана и перемещению части содержимого лимфангиона (до 80%) в соседний сегмент лимфатического русла [155]. При расслаблении слоя ГМК (диастола) давление в просвете сегмента сосуда падает, формируется ретроградно направленный градиент давления, приводящий к закрытию проксимального клапана лимфангиона. Когда давление в дистально расположенном лимфангионе становится выше, происходит открытие дистального клапана, и лимфангион заполняется лимфой. Таким образом, сокращения лимфангионов имеют отчетливые систолические и диастолические периоды, а фракция выброса и ударный объем используются для характеристики активной насосной функции лимфангиона за цикл [158, 221].

Количество перемещаемой между соседними сегментами лимфы в конечном счете определяется частотой сокращений и ударным объемом. Эти две составляющие лимфотока находятся под влиянием как внутренних, так и внешних регуляторных механизмов. При увеличении объема интерстициальной жидкости происходит увеличение тканевого давления, что способствует наполнению лимфатических капилляров и, в конечном счете, перемещению их содержимого центрипетально. В результате повышенного лимфатического наполнения происходит растяжение ЛС и увеличение конечно-диастолического диаметра. Растяжение ГМК вызывает зависящее от длины увеличение частоты и силы

сокращений. В результате увеличения силы сокращений увеличивается фракция выброса и ударный объем, определяющие лимфоток. Кроме того, лимфатическая помпа может модулироваться и внешними факторами, независимыми от растяжения ЛС. Так, рефлекторные механизмы или гуморальные реакции могут запускать хронотропные и инотропные реакции, которые способствуют увеличению частоты или силы сокращения при нормальной длине гладких мышц. В совокупности внутренние и внешние регуляторы лимфатической активности приводят к увеличению тока лимфы, что, в конечном счете, способствует предотвращению неконтролируемого повышения давления в тканях [85].

Таким образом, сократительная функция лимфатического насоса модулируется следующими факторами: преднагрузкой и постнагрузкой (скорость лимфообразования), сократимостью (инотропное состояние) и частотой сокращения, аналогично процессам, происходящим в сердце [286]. Эти данные позволяют рассматривать ЛС и сердце как объекты с существенной общностью регуляторных механизмов.

Участие лимфатической системы в защитных функциях организма

Лимфатическая система является важным компонентом иммунной системы организма, участвующей в формировании лимфоцитов, транспорте антигенов и лейкоцитов в составе лимфы. В периферических тканях, где лимфатические капилляры образуют обширную сеть, происходит интравазация лейкоцитов, чему способствуют морфологические особенности данного участка сосудистого русла: фенестрированная базальная мембрана, наличие первичных клапанов, образованных лимфатическими эндотелиальными клетками. После попадания в сосуд лейкоциты мигрируют в просвете капилляров в течение нескольких часов [81], чему способствует низкая скорость лимфотока в этом отделе лимфатического русла (средняя скорость 3-5 мкм/с). Лейкоцитарный пул афферентной лимфы представлен преимущественно Т-клетками (80–90%), дендритными клетками (5–15%), единичными моноцитами, макрофагами, В-

клетками и гранулоцитами [162]. Таким образом, основными типами клеток, мигрирующими через афферентные ЛС, являются антигенпрезентирующие дендритные клетки (ДК) и Т-клетки [91, 92].

ДК после распознавания антигена созревают и под влиянием хемокинового рецептора CCR7 и его хемокинового лиганда CCL21 [89], мигрируют через афферентные ЛС к ЛУ, где вызывают адаптивные иммунные ответы [173]. Другим хемоаттрактантом, способствующим миграции ДК, является сигнальный фосфолипид сфингозин-1-фосфат, который продуцируется эндотелиальными клетками ЛС и присутствует в высоких концентрациях в крови и лимфе [122].

Известно, что наивные лимфоциты постоянно рециркулируют между кровью и вторичными лимфоидными органами [253]. Внутри ЛУ наивные Т-клетки последовательно взаимодействуют с многочисленными ДК в поисках антигена. Если Т-клетка не находит свой родственный антиген, она мигрирует через корковые и мозговые синусы и покидает ЛУ через эфферентный ЛС. И наоборот, после распознавания антигена наивные Т-клетки пролиферируют и в течение нескольких дней дифференцируются в эффекторные Т-клетки, которые выходят из ЛУ, чтобы получить доступ к воспаленной периферической ткани и бороться с источником антигена (обычно с инфекционным агентом). После устранения возбудителя большинство эффекторных Т-клеток погибают. Однако некоторые клетки выживают и развиваются в Т-клетки памяти, которые обеспечивают местную и системную защиту в случае воздействия патогенов в будущем [253]. Таким образом, большая часть Т-клеток, перемещающихся через афферентные ЛС, представлена CD4⁺ эффекторными Т-клетками памяти, которые, как полагают, рециркулируют из периферических тканей обратно в кровообращение, обеспечивая тем самым иммунный надзор [230].

Лимфатические эндотелиальные клетки в ЛУ служат не только как выстилка для каналов, но и могут напрямую взаимодействовать с иммунными клетками [124]. Так, лимфатические эндотелиальные клетки модулируют иммунные ответы как посредством прямого взаимодействия с ДК и Т-клетками, так и посредством секреции хемокинов и цитокинов. Во время воспаления

лимфатические эндотелиальные клетки могут продуцировать иммуносупрессивные факторы – индоламин-2,3-диоксигеназу и оксид азота (NO), которые ингибируют пролиферацию Т-клеток. После разрешения воспаления лимфатические эндотелиальные клетки могут удерживать антигены в течение длительных периодов времени (явление, называемое архивированием антигенов) и передавать их ДК, тем самым способствуя поддержанию иммунологической памяти.

При воспалении образование жидкости в интерстициальном пространстве значительно возрастает за счет увеличения внесосудистой жидкости, происходящей из более проницаемых, воспаленных кровеносных сосудов. В результате дренирования избыточной тканевой жидкости лимфатическая система обеспечивает гомеостаз интерстиция. Повышенное давление интерстициальной жидкости приводит к расширению инициальных ЛС, что облегчает попадание жидкости, а также клеток воспаления в ЛС и удаление их из воспаленной ткани [245].

Таким образом, ЛС представляют собой важный компонент местного иммунитета и являются основным путем связи периферических тканей с иммунной системой. В дополнение к транспортным функциям демонстрируется иммуномодулирующая роль ЛС, реализуемая, в первую очередь, за счет секреторной активности лимфатических эндотелиальных клеток.

1.1.2. Электрофизиологические свойства лимфатических сосудов

Средние значения мембранного потенциала покоя (МПП) гладкомышечных клеток ЛС, которые получены с помощью внутриклеточных микроэлектродов, варьирует в незначительных пределах, что, вероятно, связано с методологическими приемами при его регистрации и видоспецифичностью. Так, согласно результатам, полученным разными исследователями, среднее значение МПП лимфатической гладкой мускулатуры морской свинки составило от -

60,8±1,1 до -65,1±1,5 мВ [270, 280]. В брыжеечных ЛС крыс МПП гладких мышц составил -48±2 мВ в нерастянутых сосудах и -36±1 мВ при их растяжении [115].

На основании экспериментов, проведенных на брыжеечных ЛС морских свинок и овец, было высказано предположение, что в создании мембранного потенциала участвуют Ca^{2+} -активированные хлорные каналы, Ca^{2+} -активированные калиевые каналы с высокой проводимостью, калиевые каналы внутреннего выпрямления, калиевые каналы задержанного выпрямления, АТФ-чувствительные калиевые каналы [77, 279]. Кроме того, некоторыми авторами было высказано предположение, что электрогенные ионные насосы и обменники также могут принимать участие в создании МПП гладких мышц ЛС [149, 205].

В брыжеечных ЛС быка методом модифицированного одиночного сахарозного мостика (внеклеточная регистрация электрической активности) Г.И. Лобовым была зарегистрирована диастолическая деполяризация, которая предшествовала потенциалам действия [33]. В более поздних экспериментах с использованием внутриклеточных микроэлектродов в брыжеечных сосудах крупного рогатого скота было подтверждено наличие медленной диастолической деполяризации ГМК [247]. В брыжеечных ЛС морской свинки была зарегистрирована спонтанная кратковременная деполяризация (spontaneous transient depolarization, STD) [270]. Было показано, что она возникает вследствие открытия Ca^{2+} -зависимых Cl-каналов при внутриклеточном высвобождении ионов Ca^{2+} из инозитол-1,4,5-трифосфат (IP_3) -чувствительных хранилищ [249]. Х. Толанд с соавторами наблюдали сходные кратковременные деполяризации в отдельных брыжеечных лимфатических клетках овцы и продемонстрировали, что они также были вызваны открытием Ca^{2+} -активированных Cl-каналов [77]. STDs также встречаются и в брыжеечных ЛС крыс, с частотными и амплитудными характеристиками, аналогичными STDs в сосудах морских свинок [115]. Согласно высказанному предположению, STDs являются водителями ритма в ЛС, потому что они либо индивидуально, либо путем суммирования деполяризации лежат в основе потенциала действия и последующих мышечных сокращений [270]. Эта гипотеза была подтверждена и в последующих исследованиях [249, 281].

Таким образом, пространственно-временное суммирование STD приводит к уменьшению МПП до критического уровня, при достижении которого возникает быстрая деполяризация мембраны ГМК, приводящая к генерации потенциала действия (ПД). Экспериментальным путем было установлено, что в большинстве ГМК лимфатических сосудов ПД формируется в результате увеличения проницаемости Na^+ и Ca^{2+} ионных каналов [248, 258]. Кроме того, имеются сообщения об экспрессии нескольких потенциал зависимых (активируемых напряжением) Na^+ -каналов в грудном протоке и брыжеечных ЛС человека [278]. После быстрой деполяризации и овершута происходит быстрая начальная реполяризация [115, 278], которая связана с активацией Kv каналов и быстрым выходом ионов K^+ из клетки [248, 259]. Потенциал-зависимые Ca^{2+} каналы L-типа, которые открываются медленнее, чем быстрые потенциал-зависимые Na^+ -каналы, вносят вклад в формирование фазы плато ПД в гладкой мышце ЛС, которое, как полагают, сходно с плато сердечных ПД [150, 258]. Известно, что изоформа $\text{Cav}1.2$ потенциал-зависимого Ca^{2+} канала L-типа, который является доминирующим Ca^{2+} каналом в сокращении сердечной мышцы [80] экспрессируется в гладких мышцах ЛС крыс [168] и людей [150] и, по-видимому, играет ту же роль и в гладкой мышце ЛС. После фазы плато следует фаза быстрой реполяризации, возникновение которой, вероятней всего, связано с закрытием Ca^{2+} -каналов [176].

В результате возникновения ПД происходят быстрые кратковременные увеличения концентрации внутриклеточного Ca^{2+} , которые, в свою очередь, приводят к фазным сокращениям гладкомышечных клеток ЛС. Цикл последовательных процессов от возникновения ПД до сократительного ответа мышцы лежит в основе электромеханического сопряжения.

1.1.3. Сократительная активность лимфатических сосудов. Ее виды и значение.

Мышечные клетки, расположенные в стенках лимфатических коллекторов, генерируют и контролируют движение лимфы по лимфатической сети. Так как они имеют морфофункциональное сходство с ГМК кровеносных сосудов, мышечные клетки ЛС обычно классифицируются как гладкомышечные. Однако существуют различия в их сократительной функции и в сократительном механизме, что делает их уникальными.

Лимфатические сокращения, приводящие в действие лимфатический насос, являются быстрыми, с расчетной скоростью укорочения клеток примерно 2 длины клетки в секунду [175]. Кроме того, эти же ЛС могут иметь долгосрочные тонические сокращения, такие же, как и в кровеносных сосудах, используемые для контроля сопротивления потоку внутри этого сосуда. Таким образом, ГМК лимфатических сосудов имеют некоторое функциональное сходство с клетками гладких мышц сосудов, сердечными миоцитами и клетками гладких мышц желудочно-кишечного тракта. ЛС из разных тканей и разных частей лимфатического дерева проявляют разные сократительные свойства [296], то есть более мелкие периферические ЛС могут вести себя иначе, чем более крупные центральные ЛС.

Исследования М. Мутучамия и др. [192], посвященные сократительным белкам, экспрессируемым мышечными клетками ЛС, выявили механизмы, объясняющие желудочковую насосную функцию лимфангионов. Они продемонстрировали, что ГМК брыжеечных и грудных ЛС крыс содержат поперечнополосатые сократительные элементы, а также имеют общие биохимические и функциональные характеристики с клетками сердечной мышцы [192]. В частности, лимфатические гладкомышечные клетки грудного и брыжеечного протоков крысы экспрессируют изоформы SMB (smooth muscle B) тяжелых цепей миозина, которые играют важную роль в определении сократительных характеристик поперечнополосатой мышцы [112]. Кроме того,

выявлена экспрессия гена β -МНС (myosin heavy chain) в мышечных клетках брыжеечного протока, которая у грызунов связана как с медленно сокращающимися скелетными мышцами, так и с сердечной мышцей плода. Также, лимфатические ткани экспрессируют белки, характерные как для саркомерного актина, так и для актина гладких мышц сосудов [282]. Таким образом, мышечные клетки ЛС обладают уникальным сократительным механизмом, который включает как гладкие, так и поперечнополосатые компоненты.

Выделяют две основные формы лимфатической активности – фазные ритмические сокращения и тонус.

Фазное сокращение – это быстрое сокращение отдельного участка ЛС, которое сменяется его быстрым расслаблением [39]. Как правило, такие сокращения регистрируются через определенные, достаточно стабильные промежутки времени, отчего они и названы ритмическими. На Рисунках 1.6, 1.7 и 1.8 представлены варианты фазной сократительной активности брыжеечных ЛС белых крыс, полученные в проведенных нами экспериментах согласно методике, представленной в разделе «Материалы и методы исследования». Фазная сократительная активность ЛС, как правило, является спонтанной, формирующейся в результате самовозбуждения, возникающего в клетках-«пейсмекерах». В то же время, фазная активность может являться результатом внешнего воздействия на спонтанно неактивные сосуды, т.е. быть «вызванной». К факторам, вызывающим сокращения ЛС, относятся растяжение, изменение перфузионного давления и температуры, гуморальное воздействие, нервная и электрическая стимуляция. Высокая чувствительность ЛС к разнообразным факторам воздействия, является проявлением приспособительных механизмов регуляции транспорта лимфы. Фазные сокращения ЛС, являясь основной формой их моторики, способствуют продвижению лимфы по ЛС, даже в условиях отсутствия внешних, побуждающих факторов.

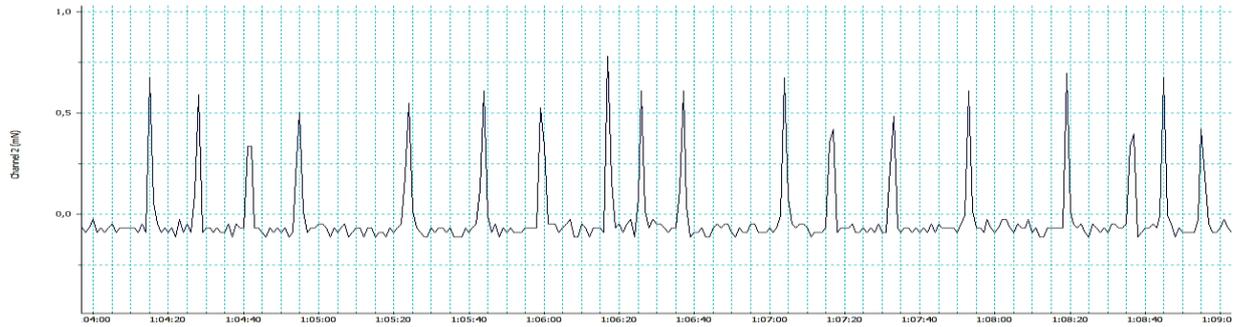


Рисунок 1.6 – Сократительная активность брыжеечного лимфатического сосуда крысы в виде одиночных сокращений. Разработан автором



Рисунок 1.7 – Сократительная активность брыжеечного лимфатического сосуда крысы в виде сгруппированных сокращений. Разработан автором

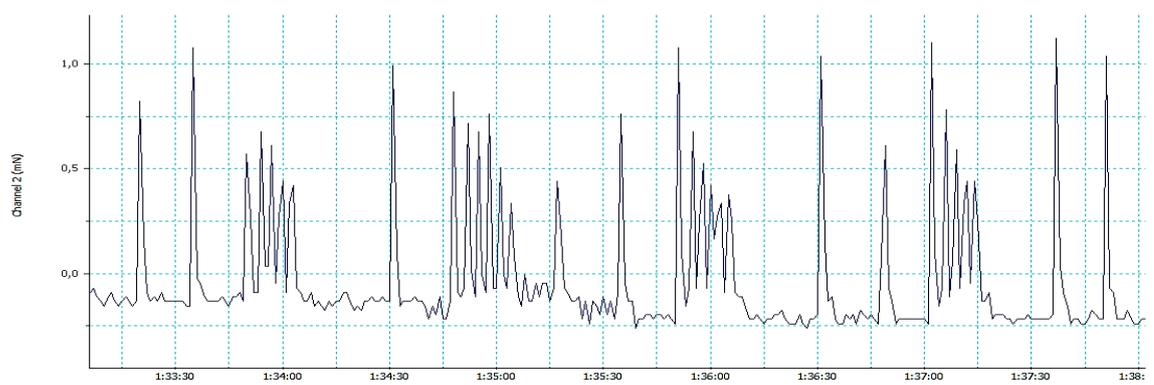


Рисунок 1.8 – Сократительная активность брыжеечного лимфатического сосуда крысы в виде чередования сгруппированных и одиночных сокращений. Разработан автором

Еще одним видом сократительной активности ЛС является тоническое напряжение стенки сосуда (сосудистый тонус), создаваемое и удерживаемое в течение продолжительного времени и являющееся основой для формирования

фазной активности. Сосудистый тонус может изменяться при действии гуморальных раздражителей, температуры, нервной и электрической стимуляции. В физиологических условиях тонус является проявлением длительного напряжения ГМК стенки ЛС. Он обуславливает жесткость стенки сосудов и препятствует их перерастяжению, создает исходный фон для фазных сокращений, поддерживает внутрисосудистое давление, изменения которого лежат в основе регуляции емкостной функции лимфатической системы. На Рисунке 1.9 представлено изменение тонического напряжения интактного изолированного брыжеечного ЛС белой крысы после воздействия норадреналином. Кривая получена в собственных экспериментах.

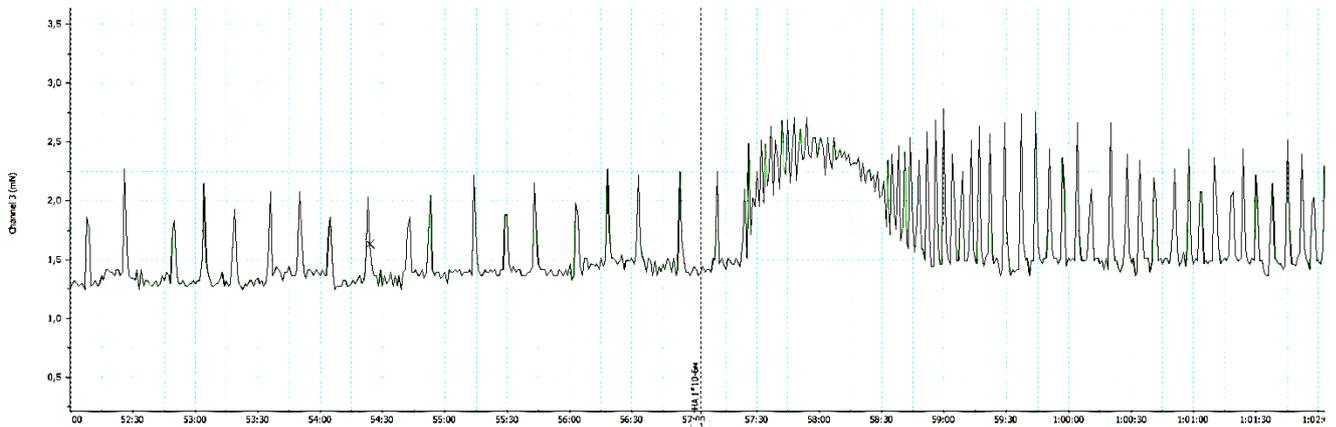


Рисунок 1.9 – Изменение тонического напряжения брыжеечного лимфатического сосуда крысы после добавления норадреналина в концентрации 1×10^{-6} М в рабочую камеру миографа при сохраненном протоке. Разработан автором

Регуляция сократительной активности лимфатических сосудов

Лимфатическое сокращение регулируется скоростью фосфорилирования/дефосфорилирования легкой цепи миозина, контролируемой активностью киназы легкой цепи миозина (КЛЦМ) и фосфатазы легкой цепи миозина (ФЛЦМ). По мере увеличения внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} , он связывается с кальмодулином (кальций-модулированным белком), и комплекс Ca^{2+} -кальмодулин активирует КЛЦМ. КЛЦМ фосфорилирует регуляторную легкую цепь миозина, вызывая активацию миозиновой АТФазы и, таким образом,

сокращение. Когда концентрация внутриклеточного Ca^{2+} уменьшается, КЛЦМ дезактивируется, что приводит к дефосфорилированию легких цепей миозина ФЛЦМ, миозиновая АТФаза деактивируется, и мышцы расслабляются (Рисунок 1.10).

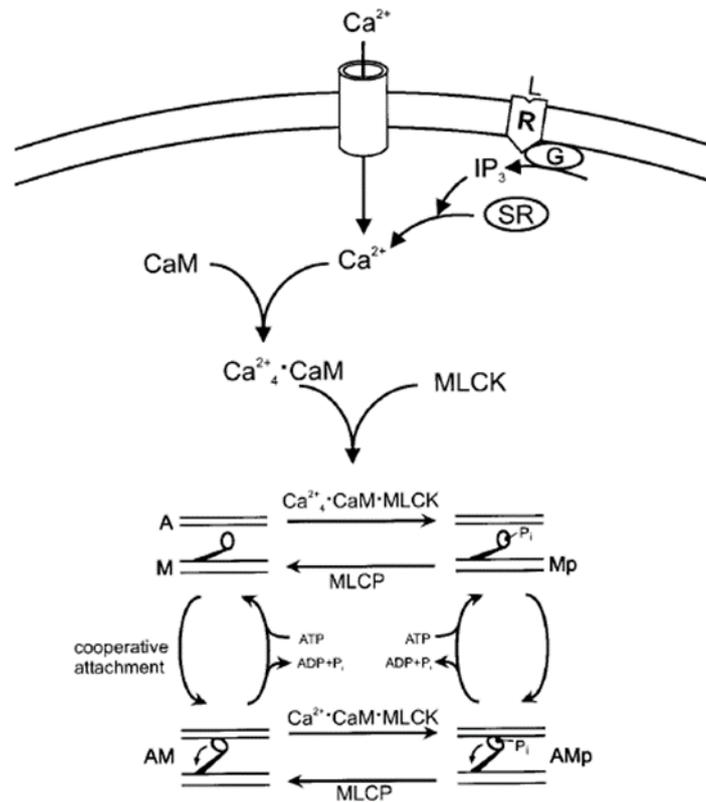


Рисунок 1.10 – Схема активации сокращения гладких мышц. G – гетеротримерный GTP-связывающий белок; R – рецептор; L – лиганд; IP_3 – инозитол-1,4,5-трифосфат; SR – саркоплазматический ретикулум; CaM – кальмодулин; MLCK – киназа легкой цепи миозина; MLCP – фосфатаза легкой цепи миозина; A – актин; M – нефосфорилированный миозин; Mp – фосфорилированный миозин; AM и AMp – силовые поперечные мостики [215].
Пояснения в тексте

Регуляция сократительной активности ЛС представлена тремя уровнями:

- ауторегуляция ритма и силы сокращений в зависимости от уровня эндолимфатического давления;
- местные нервные и гуморальные механизмы, которые изменяют насосную и емкостную функции лимфангионов в соответствии с функциональным состоянием региона и уровнем лимфообразования в нем;

– центральные нервные и гормональные влияния, подчиняющие интенсивность активного транспорта лимфы интересам всего организма [5].

Ауторегуляторные механизмы

В физиологических условиях ведущим фактором, вызывающим сокращения лимфангионов, является увеличение трансмурального давления. Как правило, сокращения возникают при растяжении стенок ЛС вследствие их заполнения и характеризуются увеличением частоты сокращений при повышении преднагрузки и сочетанным увеличением частоты и силы сокращений при повышении постнагрузки [157, 175]. При увеличении трансмурального давления с шагом от 0,5 до 10,5 см вод. ст. наблюдается увеличение тонического напряжения (миогенное сужение). При внутрисосудистом давлении меньше 0,5 см вод. ст. фазные сокращения ЛС не проявляются. Ослабление и прекращение фазной активности ЛС отмечается при повышении давления выше 15 см вод. ст. [196].

Стимулирующее влияние механического воздействия является ауторегуляторным, поскольку спонтанная сократительная активность проявляется в деэндотелизированных лимфангионах, а также при перфузии лимфангиона раствором, содержащим тетродотоксин — блокатор быстрых натриевых каналов [42]. Такая ауторегуляция, или миогенная регуляция, необходима для обеспечения соответствия параметров сократительной активности ЛС уровню лимфообразования в органах и тканях. Это позволяет поддерживать постоянство гидростатического давления в интерстициальном пространстве [32, 196].

Местные нервные и гуморальные механизмы

Эндотелий-зависимые регуляторные механизмы относятся к местным механизмам регуляции и носят преимущественно локальный характер. В первую очередь, как и в кровеносных сосудах, это достигается за счет синтеза и высвобождения эндотелиальных факторов, способствующих активации или подавлению сократительной активности ЛС. Основными причинами,

способствующими выделению этих факторов, как правило, являются растяжение стенки сосуда, изменение скорости лимфотока и возникающее в связи с действием этого фактора напряжение сдвига («shear-stress») и стимуляция эндотелия биологически активными веществами [293].

Известно, что эндотелий продуцирует ряд вазодилататоров, к числу которых относятся NO, гиперполяризующий фактор (EDHF) и простагландин I₂ (PGI₂). Каждое из этих соединений осуществляет вазодилататорный эффект посредством активации определенного сигнального механизма. К наиболее изученным эндотелиальным факторам относится NO. Экспериментально показано, что NO вызывает расслабление лимфатических гладких мышц в изолированных грудных протоках собак [127], трахеобронхиальных ЛС свиней [204], а также в хвостовых ЛС крыс [226]. В физиологических условиях эта реакция является преимущественно поток-индуцируемой и реализуется за счет активации образования циклического гуанозинмонофосфата (ц-ГМФ) [132, 133]. Стимуляция эндотелия ацетилхолином также приводит к расслаблению предварительно сокращенных ЛС [204] и замедляет спонтанные фазные сокращения [132]. Оба эти эффекта опосредуются, по крайней мере частично, высвобождением NO эндотелием.

EDHF, представляющий собой вещество и/или электрический сигнал, который генерируется или высвобождается из эндотелия, оказывает расслабляющее действие на ГМК посредством их гиперполяризации, не связанной с NO и простациклином [113].

Другим важным продуцируемым эндотелием вазодилататором является PGI₂, или простациклин – метаболит арахидоновой кислоты [19, 84]. PGI₂ активирует специфический рецептор клеточной поверхности (IP-рецептор), который связан с аденилатциклазой (АЦ) через G-белок. Повышение уровня циклического аденозинмонофосфата (ц-АМФ) считается ключевым клеточным событием, запускающим расслабление сосудов агонистами IP-рецептора. [84, 198]. Согласно имеющимся сведениям, PGE₂ также ингибирует сократительную

активность брыжеечных ЛС морской свинки. Предполагаемым механизмом является активация протеинкиназы А и АТФ-чувствительных K^+ каналов [84].

К наиболее характерным вазоконстрикторам эндотелиальной природы относится эндотелин-1 (ЕТ-1). Низкие концентрации ЕТ-1 (≤ 10 нМ) увеличивают лимфатическую сократительную активность, а более высокие концентрации (≥ 100 нМ) вызывают спазм ЛС брыжейки морских свинок с прекращением фазной активности. Увеличение лимфатической вазомоторики опосредовано эндотелиновыми рецепторами типа А (ЕТ_А) гладких мышц и активацией каскада G-белок – PLC (фосфолипаза С) – IP₃, который вызывает выброс ионов Ca^{2+} из внутриклеточных депо и, как следствие, формирование пейсмекерных потенциалов. Высокие концентрации ЕТ-1 вызывают нарушение кальциевого гомеостаза, вызывая вазоспазм, вызванный чрезмерным притоком ионов Ca^{2+} в основном через депо-управляемые каналы. Потенциал зависимые Ca^{2+} каналы L-типа, также вносят свой вклад, но в гораздо меньшей степени [295].

Биологически активным веществом, разнонаправленно модулирующим лимфатическую сократительную активность, является АТФ. Стимуляция, вызываемая эндотелиальными пуринорецепторами P₂, увеличивает синтез фосфолипазы A₂ и продукцию тромбоксана A₂, метаболита арахидоновой кислоты, который действует как эндотелиальный констрикторный фактор [123]. АТФ-опосредованные ингибирующие ответы могут быть частично связаны с выработкой эндогенного NO, вовлечением АТФ-чувствительных K^+ каналов или активацией аденозиновых рецепторов A₁ в лимфатических гладких мышцах и эндотелии [67].

Среди биогенных аминов наиболее подробно исследовано влияние гистамина и серотонина. Гистамин дозозависимо модулирует сократительную активность лимфангионов брыжеечных ЛС крысы. Стимулирующие эффекты гистамина, проявляющиеся при действии его в концентрациях 10^{-9} – 10^{-7} М, реализуются посредством активации H₁-рецепторов миоцитов, что способствует поддержанию активного транспорта лимфы, в частности, при воспалении. Высокие концентрации гистамина (10^{-6} – 10^{-4} М) тормозят моторику ЛС

посредством воздействия на H_2 -рецепторы миоцитов и, возможно, H_1 -рецепторы эндотелиальных клеток [10].

Серотонин (5-НТ) обладает выраженным стимулирующим дозозависимым ($10^{-8} - 10^{-5}$ М) влиянием на сократительную активность ЛС крысы. Установлено, что стимулирующие реакции 5-НТ реализуются посредством активации 5-НТ₂-рецепторов и угнетения синтеза NO и простагландинов эндотелиальными клетками. Кроме того, стимулирующий эффект высоких концентраций серотонина может быть обусловлен активацией α_2 -адренорецепторов [12].

Центральные нервные и гормональные влияния

Сократительная активность ЛС в значительной степени модулируется влиянием нервных и гуморальных факторов. ЛС иннервируются нервными волокнами, сопровождающими кровеносные сосуды, причем в стенке ЛС количество нервных элементов существенно меньше, чем в стенке кровеносных сосудов [39]. В соответствии с типом нейротрансмиттера, выделяющегося в нервных окончаниях, принято выделять адренергическую, холинергическую и пептидергическую иннервацию ЛС.

Нейронная модуляция была подробно исследована как с помощью экзогенного применения предполагаемых нейротрансмиттеров, так и с помощью стимуляции электрическим полем. Наиболее изученным из всех нейромедиаторов является норадреналин, при экзогенном применении которого (в концентрациях $<10^{-6}$ М) наблюдается увеличение сократительной активности ЛС [180]. Этот эффект обеспечивается стимуляцией α -адренорецепторов, которая приводит к активации фосфолипазы С через G-белки, с последующей продукцией внутриклеточного посредника IP_3 и повышением внутриклеточного высвобождения ионов Ca^{2+} . В концентрациях, превышающих 10^{-6} М, норадреналин подавляет сократительную активность, посредством активации β -адренорецепторов [265]. В результате происходит повышение продукции ц-АМФ, который ингибирует активацию КЛЦМ и приводит к расслаблению ГМК.

В присутствии ацетилхолина сократительная активность ЛС снижается. Это действие в основном опосредуется стимуляцией М-холинорецепторов, расположенных на эндотелии, с последующей активацией синтеза NO, поскольку в деэндотелизированных сосудах реакция на ацетилхолин отсутствует [204].

Гормоны и циркулирующие медиаторы также оказывают существенное влияние на функции ЛС. Эти факторы высвобождаются в интерстициальную жидкость, окружающую ЛС, из кровотока или паренхиматозных клеток. Крупные ЛС имеют собственное кровоснабжение через мелкие сосуды, подобные *vasa vasorum* (т.е. *vasa lymphorum*), которые могут нести медиаторы, способные действовать непосредственно на ЛС [206]. Гормоны и циркулирующие медиаторы оказывают как стимулирующее, так и ингибирующее действие на сократительную активность ЛС. Действие катехоламинов и некоторых нейропептидов, которые могут действовать через циркулирующую форму гормонов, а также паракринно, приведено выше. Известно также, что ЛС являются мишенями для пептидов и стероидных гормонов. Хорошо исследовано влияние пептидного гормона тиролиберина, который в широком диапазоне концентраций (от 10^{-18} до 10^{-4} М) обладает стимулирующим влиянием на сократительную активность ЛС и вызывает активацию сократительной активности брыжеечных ЛС быка и крысы [11, 46]. Стимулирующее влияние ультрамалых доз тиролиберина (10^{-18} М) на ГМК брыжеечных ЛС быка реализуется посредством деполяризации мембраны и стимуляции адренорецепторов [25]. Гидрокортизон в физиологической концентрации стимулирует фазную активность брыжеечных ЛС быка, за счет увеличения входа ионов Ca^{2+} и деполяризации мембраны. В более высоких концентрациях наблюдается снижение фазной активности ЛС на фоне более выраженной деполяризации мембраны [31, 43].

Последние десятилетия отмечены ростом исследований, посвященных вопросам пептидэргической регуляции физиологических и патофизиологических процессов. Установлен широкий спектр соединений пептидной природы, обладающих модулирующим влиянием на функцию ЛС. Так, вещество Р (субстанция Р, SP), представляющее собой нейропептид и обладающее широким

спектром биологического действия, является предполагаемым модулятором функции ЛС при воспалении. Установлено, что SP дозозависимо увеличивает частоту сокращений брыжеечных ЛС крысы, на фоне уменьшения диаметра сосудов и увеличения объема лимфатической перекачки. Сформулирована гипотеза, согласно которой SP и другие медиаторы воспаления, которые модулируют лимфатическую помпу *in vivo*, активируют коллекторные ЛС, что способствует увеличению их устойчивости растяжению при более высоком внутрипросветном давлении, возникающем во время воспаления и сопутствующего отека [189]. Кроме того, данный нейропептид вызывал появление фазных сокращений ЛС, изначально не проявляющих спонтанную активность, что являлось фактором дополнительной стимуляции лимфотока [189]. Передача сигнала в гладкомышечных клетках ЛС происходит через рецепторы эндотелиального нейрокина (NK) 1 и 3 типов по отдельности, либо через комбинацию этих рецепторов, вызывая выработку и высвобождение простагландина H₂ / тромбоксана A₂ [252].

Полифункциональное действие пептидных регуляторов обеспечивает их важнейшую роль в адаптационных процессах в организме, регуляции функции иммунной, сердечно-сосудистой систем, эмоционального состояния. В ряду стресс-лимитирующих систем заметная роль принадлежит эндогенной опиоидной системе [55]. Опиоидные пептиды оказывают модулирующий эффект в отношении гормональной системы, способствуя снижению секреции стресс-гормонов, а также повышают устойчивость миокарда к гипоксии у стрессированных животных. При этом их роль в регуляции функций сосудистой системы изучена существенно в меньшей степени. Изучение влияния опиоидных пептидов на лимфатическую систему, играющую выраженную роль в поддержании гомеостаза, до настоящего исследования практически не проводилось.

1.2. Эндогенная опиоидная система. Структура и функции в организме.

Опиоидэргическая система, включающая специфические опиоидные (опиатные) рецепторы, группу нейропептидов-лигандов, известных как эндогенные опиоиды (опиоидные пептиды, ОП), а также ферменты, осуществляющие их синтез и инактивацию, модулирует многочисленные физиологические процессы в организме. Первый пик исследований опиоидэргической системы пришелся на 70–80-е годы XX столетия, когда были впервые определены типы ОР, установлена структура ряда ОП и их антиноцицептивная роль в организме [95, 111, 153, 253]. В середине 90-х годов исследования роли эндогенной опиоидной системы (ЭОС) для организма продолжились, и спектр выполняемых в организме функций опиоидэргической системы расширился. В глобальном смысле функция ЭОС заключается в противодействии влиянию стресса [260, 273]. При этом стресс можно рассматривать как любое серьезное возмущение физиологического гомеостаза, в том числе операционные вмешательства и болевое воздействие. При этом функция опиоидной системы заключается в противодействии кардинальным влиянием и возвращение «на свои места», то есть в модуляции стрессовых реакций. При изучении роли β -эндорфина в стрессовых ситуациях, Я. Вининг с коллегами высказал предположение, что пептид может стимулировать поведение, которое восстанавливает состояние гомеостатического баланса и благополучия, а также, он может ингибировать поведенческие изменения, которые потенциально нарушают это состояние [273].

При изучении уровней ОП в плазме крови на фоне эмоционально-болевого стресса было показано значительное повышение β -эндорфина, лей-энкефалина и мет-энкефалина [29]. При этом повышенное содержание β -эндорфина у животных в эксперименте сохранялось на протяжении суток, пик подъема лей-энкефалина пришелся на 6-й час наблюдений, а подъем концентрации мет-энкефалина в плазме крови крыс был зарегистрирован через 1 час от начала стрессорного воздействия, без повышения в остальные часы наблюдений. Такая динамика

изменений уровня эндогенных опиоидов у экспериментальных животных наблюдалась как при эмоционально-болевым стрессе, так и на модели стресса, вызванного коронароокклюзией [29]. Результаты многочисленных исследований неизменно показывают увеличение уровня β -эндорфина в плазме после аэробных упражнений высокой интенсивности, которые также можно рассматривать, как стрессовый фактор [62, 216]. Увеличение содержания ОП в плазме крови происходит нелинейно с резким повышением в конце упражнений или в восстановительном периоде – в 3,5-6,5 раз превышая уровень в покое. При этом упражнения низкой интенсивности не являются стимуляторами повышенного высвобождения β -эндорфина [135, 216, 219]. При повышении интенсивности физической нагрузки до умеренной, увеличение содержания β -эндорфина в крови было неодинаково в разных исследованиях и определялось как порогом интенсивности, необходимым для стимуляции β -эндорфина, так и продолжительностью упражнений умеренной интенсивности [143, 219]. Кроме того, причина таких «неодинаковых» результатов, полученных при выполнении упражнений умеренной интенсивности, может быть связана с широкой вариабельностью отдельных ответов.

Биологические эффекты эндогенных ОП (эндорфинов, энкефалинов, эндоморфинов, динарфинов) выявленные в центральной и периферической нервной системе, позволили рассматривать их как компоненты антиноцицептивной системы [61]. Однако, ОП участвуют и в регуляции функций дыхательной [213], сердечно-сосудистой систем [98], иммунного ответа [285], регуляции ионного гомеостаза [99]. Опиоидные агонисты заявлены как антиангиогенные факторы развития сосудов и опухолей [291]. Одной из наиболее значимых функций ОП является опосредованная нейро- и кардиопротекция [52, 244]. Так, DAMGO (селективный агонист μ -ОР) уменьшал размер инфаркта, вызванного ишемией/реперфузией [79]. ОП принимают участие в регуляции функций желудочно-кишечного тракта [22], выполняя роль транмиттеров. ОР в желудочно-кишечном тракте присутствуют в ГМК и на окончаниях симпатических и сенсорных периферических нейронов [289]. Все типы ОР были

экспрессированы в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) грызунов, свиней и человека, распределение которых меняется в зависимости от региона и слоя ЖКТ [217]. После высвобождения из кишечных нейронов, ОП изменяют функции ЖКТ путем взаимодействия с ОР в энтеральных сплетениях, вызывая главным образом торможение как моторики, так и секреторной функции кишечного эпителия [289]. Прямое тормозное действие ОП на нейроны энтеральной нервной системы лежит в основе фармакологического применения синтетических аналогов ОП, обладающих противодиарейным действием. К таким препаратам относится широко применяемый в клинической практике лоперамид.

Доказана роль эндогенных опиоидов в модуляции стволовых клеток (СК) и реакции клеток на стресс: обнаружено усиление пролиферации и миграции нейтральных СК агонистами κ -ОР, динорфином А (1-17) и U50488, которое частично устранялось при обработке клеток κ -селективным антагонистом нор-биналторфимином (nBNI) [151]. Дафна Уилнер с коллегами исследовала роль морфина в пролиферации, апоптозе и дифференцировке нейтральных клеток-предшественников мыши в раннем пренатальном периоде [242]. Было обнаружено, что морфин снижал пролиферацию данных клеток, индуцировал активность апоптотического фермента каспазы-3 дозозависимым образом и повышал уровни активной каспазы-3 в пролиферирующих клетках. Цитопротекторная роль пептида DADLE (селективный агонист δ -ОР) была продемонстрирована в мезенхимальных СК, полученных из пуповинной крови человека. В условиях стресса, вызванного отсутствием сыворотки, DADLE значительно повышал жизнеспособность клеток и их выживаемость [227]. В этих же клетках, обработанных H_2O_2 , DADLE через δ -ОР, также улучшал выживаемость СК [161]. Цитопротекторный эффект DADLE был получен на мезенхимальных СК при моделировании патологического состояния, имитирующего гипоксию-реперфузию, вызванную обработкой хлоридом кобальта [194]. Показано, что эндогенные опиоиды могут быть вовлечены в нейрогенез, однако, их участие различно [125]. Так, κ -ОР связаны со снижением нейрональной дифференцировки и астрогенеза, а μ - и κ -ОР способствуют

нейрональной дифференцировке [193]. К. Ямамидзу с коллегами исследовал роль опиоидов в дифференцировке сосудов, используя эмбриональные СК. Добавление агонистов к-ОР к этим клеткам ингибировало дифференцировку эндотелиальных клеток и формирование трехмерных сосудов. Ингибирующий эффект агонистов к-ОР на развитие сосудов обусловлен ингибированием передачи сигналов ц-АМФ / протеинкиназы А [266]. к-ОР были обнаружены на плазматических мембранах и в ядрах GTR1-эмбриональных стволовых клеток мышей. В тех же клетках была обнаружена внутриклеточная секреция динорфина В [276]. Все это указывало на предполагаемую роль опиоидергической системы в кардиогенезе, что было доказано С. Вентурой с коллегами: динорфин В в эмбриональных СК инициировал кардиогенез, опосредованный передачей сигналов протеинкиназой С [110, 223].

Представленное многообразие эффектов ОП, способствующих восстановлению гомеостаза, позволяет отнести ЭОС, наряду с антиоксидантной, серотонинергической, ГАМК-ергической и комплексом простагландинов, к «стресс-лимитирующей системе».

Многообразные эффекты опиоидергической системы реализуются посредством взаимодействия ОП (эндогенных и экзогенных) со специфическими мембранно-связанными опиоидными рецепторами. Эти рецепторы называются опиоидными, поскольку их эндогенными лигандами являются пептиды, действие которых напоминает действие опиатных препаратов. ОР – это белковые молекулы, которые располагаются на внешней поверхности мембран и способны стереоспецифически связывать L-наллоксон [160].

С помощью фармакологических и биохимических методов идентифицированы следующие типы ОР: мю-ОР (μ -, MOR), дельта-ОР (δ -, DOR) и каппа-ОР (κ -, KOR), названия которым давались буквами греческого алфавита в зависимости от их анатомического положения или химических соединений, используемых для их идентификации. Так, морфин был первым веществом, у которого была обнаружена способность связываться с μ -ОР, а к-ОР названы в честь обнаружения их связывания с кетоциклозацином [262]. Рецептор с высоким

средством к энкефалинам был обнаружен в семявыносящих протоках мышей и назван δ -рецептором [116]. Эффекты, вызываемые стимуляцией данных рецепторов, ингибируются налоксоном. Позже семейство ОР пополнилось четвертым представителем, который в силу сходства молекулярной структуры с другими ОР был назван опиоидподобным рецептором (ORL-1), так как не ингибировался налоксоном [191]. Эндогенный пептидный агонист этих рецепторов назвали ноцицептином, а сам рецептор – ноцицептивным (NOR), поскольку активация центральных ORL-1 приводит к усилению реакции на болевой раздражитель. Все четыре вида рецепторов принадлежат к семейству G-белок-сопряженных рецепторов.

Опиоидные пептиды и их специфические рецепторы широко распространены в организме, преимущественно в различных отделах центральной и периферической нервной системы [72, 277], а также в периферических органах, таких как легкие, сердце, печень, желудочно-кишечный тракт и репродуктивная система [70, 142, 289]. Экспрессия и распределение этих рецепторов значительно различаются в разных органах, а также у разных видов животных [71]. Длительное время ОП позиционировались исключительно как анальгетики, однако в последующих исследованиях обнаружено их выраженное влияние на когнитивные функции (память, способность к обучению), участие в процессах терморегуляции, регуляции аппетита, полового поведения, дыхания, участие в стресс-реализующих механизмах. Широкое распространение в организме и многообразие функций обосновывают принадлежность опиоидов к классу регуляторных пептидов.

К эндогенным ОП относятся эндорфины, энкефалины, эндоморфины, динорфины, а также неопиоидный пептид – ноцицептин. Эндогенные ОП не обладают высокой специфичностью для определенного подтипа ОР. Так, β -эндорфин является агонистом для всех подтипов ОР, проявляя при этом бóльшую аффинность к μ - и δ -рецепторам. Мет- и лей-энкефалины имеют наибольшее сродство к δ -ОР, меньшее к μ -ОР и очень низкое к κ -ОР. Динорфины имеют высокое сродство к κ -ОР, но могут связываться и с подтипами μ - и δ -

Эндоморфин-1 и -2 представляют собой эндогенные ОП с высокой селективностью для μ -ОР. Ни один из этих опиоидов не проявляет сродство к NOR, аналогично тому, как ноцицептин не имеет сродства к μ -, δ -, κ -ОР. В Таблице 1.1 представлена избирательность ОП к различным подтипам ОР.

Таблица 1.1 – Селективность эндогенных опиоидных пептидов к различным подтипам опиоидных рецепторов, где ●●● – высокое сродство, ●● – промежуточное сродство, ● – низкое сродство, × – нет сродства

Эндогенные опиоиды	Типы рецепторов			
	μ -ОР	δ -ОР	κ -ОР	NOR
Эндоморфины 1/2	●●●	×	×	×
Динорфин А/В	●●	●	●●●	×
β -эндорфин	●●●	●●●	●	×
Мет-, Лей-энкефалины	●●	●●●	×	×
Ноцицептин	×	×	×	●●●

1.2.1. Механизмы действия опиоидных пептидов

Опиоидные рецепторы, относящиеся к семейству G-белок-сопряженных рецепторов (GPCR), не имеют прямой связи с эффекторными внутриклеточными белками, а передают информацию через G-белки, что приводит к запуску целого каскада биохимических превращений, вызывающих ответную реакцию клетки. G-белок является гетеротримером и состоит из трех субъединиц – α , β и γ . После активации агонистом ОР происходит диссоциация $G\alpha$ и $G\beta\gamma$ субъединиц, каждая из которых продолжают взаимодействовать с различными внутриклеточными эффекторами, включая активацию $G\alpha_{i/o}$ белок-сопряженного пути (ц-АМФ), $G\beta\gamma$ -модуляцию различных ионных каналов и внутриклеточных киназных путей, а также G-белок-связанные рецепторные киназы, бета-аррестин и члены семейства митоген-активируемых протеинкиназ (p.38, JNK, ERK1/2) [76].

В результате активации G-белок управляемых калиевых каналов внутреннего выпрямления (K_{ir3}), возникает гиперполяризация клетки, что проявляется снижением ее активности [229]. Такой пример взаимодействия μ - и δ -ОР продемонстрирован в нейрональной ткани [128]. В той же нейрональной

ткани активация κ -ОР приводит к угнетению Ca^{2+} тока, вследствие закрытия потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов [166], что также приводит к снижению активности клетки. κ -ОР-опосредованное ингибирование кальциевой проводимости связано с прямым связыванием субъединицы $G\beta\gamma$ с кальциевым каналом, в результате чего происходит его инактивация. G-белок опосредованным механизмом действия ОР является снижение продукции ц-АМФ посредством ингибирования АЦ, которая ингибируется субъединицей $G\alpha$. В частности, агонисты δ - и κ -ОР ингибируют ГТФ-стимулированную активность АЦ сарколеммы, тогда как селективные агониста μ -ОР не оказывают такого влияния [209]. Согласно имеющимся в научной литературе сведениям, за счет стимуляции μ -ОР усиливается активность синтазы NO и высвобождение NO [190] и, как следствие, увеличение содержания ц-ГМФ – вторичного мессенджера, опосредующего действие NO на клетку [63, 82]. В некоторых клетках опиоиды могут увеличивать внутриклеточный пул Ca^{2+} , высвобождая его внутриклеточные запасы путем активации фосфолипазы C, которая, в свою очередь индуцирует образование вторичных мессенджеров IP_3 и диацилглицерида (ДАГ) [164]. Так, активация κ -ОР вызывает мобилизацию внутриклеточного кальция через IP_3 -путь в миоцитах желудочков крысы [169].

G-белок-опосредованный механизм передачи сигнала GPCR (в том числе и ОР), относится к общепринятым или «каноническим». Однако, в научной литературе последнего десятилетия описаны иные («неканонические») механизмы передачи сигнала GPCR. Во-первых, передача сигналов G-белками не ограничивается только плазматической мембраной, поскольку они могут модулировать множество эффекторных молекул и изнутри эндосомальных мембран [145]. Кроме того, GPCR могут образовывать функциональные димеры, которые могут влиять на связывание лиганда, аллостерию, транспорт рецепторов и селективность трансдуктора [56, 199]. В-третьих, доказано, что GPCR способны напрямую взаимодействовать с рядом эффекторных белков независимым от G-белка образом, включая β -аррестины или другие каркасные белки для инициирования дополнительных сигнальных каскадов [284]. Наконец, GPCR из

всех классов могут связываться с несколькими G-белками [236]. Все это указывает на то, что грань между, «канонической» и «неканонической» передачей сигналов становится все более размытой, а открытия последних лет привели к возникновению концепции лиганд-направленной передачи сигналов рецептора, также называемой функциональной селективностью или смещенным агонизмом – способностью избирательно и предпочтительно активировать специфические сигнальные пути [267].

В последнее десятилетие ряд научных работ посвящен изучению проявления смещения передачи сигналов эндогенными и синтетическими опиоидами, в результате которого доказано существование смещенного агонизма и в системе ОП [73, 74]. Группой ученых было протестировано порядка двух десятков ОП и показано, что все они связывают и активируют три ОР, а каждый пептид способен активировать передачу сигналов G-белка всеми тремя типами ОР, хотя и с разной активностью. Было выявлено, что некоторые эндогенные ОП благоприятствуют определенным сигнальным путям на трех рецепторах, приводящим к смещенной передаче сигналов [75]. Таким образом, эндогенные опиоиды контролируют физиологические процессы посредством смещенного агонизма, что подчеркивает сложность передачи сигналов в ЭОС, в составе которой экспрессируются множественные ОР и/или высвобождается множество ОП [75].

Наряду с эффектами ОП, реализуемыми через активацию ОР, опубликованы данные о неопиоидных действиях различных ОП, которые, в отличие от опиоидных эффектов, не отменяются налоксоном и реализуются через неопиоидные рецепторы [288]. Специфические неопиоидные рецепторы для β -эндорфина обнаружил Э. Хазум (E. Nazum) с коллегами на культивируемых человеческих лимфоцитах с использованием ^{125}I -меченного D-Ala² β -эндорфинового аналога в исследованиях связывания рецепторов [141]. Налоксон-нечувствительный рецептор β -эндорфина был идентифицирован в перитонеальных макрофагах мыши [290]. Позднее появилась серия синтетических β -эндорфиноподобных пептидов, действующих через неопиоидные β -

эндорфиновые рецепторы на Т-лимфоцитах [255], на макрофагах [47] и в мозговых мембранах крысы [254]. Неопиоидные эффекты динорфина А наблюдал в 1982 г. Дж. Майкл Уокер с коллегами, демонстрируя сильные и длительные изменения в двигательных функциях и на электроэнцефалограмме крыс, которые не блокировались даже высокими концентрациями налоксона [201]. Позднее было обнаружено, что вызванная динорфином А аллодиния и гипералгезия, опосредована его взаимодействием со спинномозговым NMDA рецептором (ионотропный рецептор глутамата, селективно связывающий N-метил-D-аспартат) [243]. Синди Тейлор с коллегами сообщил, что динорфин А стимулирует функцию гипофизарно-надпочечниковой функции эмбриона яйцеклеток через неопиоидный механизм [107]. А возбуждающее действие спинномозгового динорфина А, вероятно, связано с усилением притока Ca^{2+} посредством неопиоидных, не-NMDA-потенциалзависимых Ca^{2+} -каналов [109]. Неопиоидные эффекты Met-энкефалина обеспечиваются его высокой чувствительностью к OGF-рецептору (рецептор опиоидного фактора роста), который не имеет гомологии с классическими ОР [292].

1.2.2. Эндоморфины – эндогенные агонисты μ -опиоидных рецепторов

Эндогенные опиоидные тетрапептиды эндоморфин-1 и эндоморфин-2 (структурные формулы Tyr-Pro-Trp-Phe-NH₂ и Tyr-Pro-Phe-Phe-NH₂ соответственно) были классифицированы как эндогенные лиганды к μ -ОР: в синаптических плазматических мембранах, полученных из мозга крыс, показана высокая аффинность ($K_i = 360$ и 690 pM, соответственно) и селективность (в 4000 и 13400 раз больше по сравнению с δ -ОР, и в 15000 и 7600 раз, соответственно, по отношению к k-ОР) [57]. Эндоморфины обладают более высокой селективностью к μ -ОР в сравнении с эндорфинами и энкефалинами.

С помощью радиоиммуноанализа и иммуноцитохимии была выделена и локализована иммунореактивность эндоморфинов в нервной системе человека, обезьяны, быка, морских свинок, крыс и мышей. Исследование распределения

эндоморфина-1 показали, что он расположен главным образом в таламусе, гипоталамусе, коре и полосатом мозге головного мозга [57]. С. Мартин-Шильд с коллегами продемонстрировал распределение эндоморфина-2 в продолговатом и спинном мозге, а также в ганглиях спинного корешка [170]. Продемонстрировано присутствие эндоморфин-2-иммунологической активности в висцеральных ганглиях (узловых ганглиях) и афферентах блуждающего нерва [119]. Нейроны миентериального и подслизистого сплетений в толстой кишке крысы были идентифицированы как экспрессирующие массовую агрегацию эндоморфина 2 [197]. Кроме того, эндоморфины были идентифицированы в иммунной системе – обнаружена эндоморфиновая иммунореактивность в тканях селезенки и тимуса крыс [202], продемонстрировано присутствие эндоморфинов в нормальных лимфоцитах крови человека [208], эндоморфиновая иммунореактивность присутствовала в макрофагах и В-клетках, с минимальным окрашиванием в Т-клетках [235].

Уровень эндоморфинов, измеренный в мозговой ткани быка составляет 2,1 пмоль/г [57]. Содержание эндоморфинов в ткани мозга человека примерно в 70 раз выше и составляет 151 пмоль/г ткани [159]. Эндоморфины были обнаружены в экстрактах селезенки и тимуса крысы, где среднее их содержание составило 150 - 440 пг/г ткани [202].

Наиболее значимым эффектом эндоморфинов является их антиноцицептивное действие. Кроме того, эндоморфины способствуют снижению чувствительности нейронов дыхательного центра к углекислому газу, вызывая угнетение дыхания [100]. Эндоморфин-2 секретируется в интернейронах и моторных нейронах интермурального и субмукозного сплетений толстой кишки крысы, где, активируя пресинаптические рецепторы, вызывает усиление спонтанной моторики [197]. Выявлена вазодилаторная активность эндоморфинов, приводящая к снижению системного АД. Показано дозозависимое снижение системного АД у крыс при внутривенном введении эндоморфинов в диапазоне концентраций 10-100 нмоль/кг. Снижение АД в ответ на введение эндоморфинов связано со значительным снижением ЧСС, сердечного выброса и

общего периферического сопротивления [117]. Этой же группой авторов было обнаружено дозозависимое снижение системного АД у кроликов в диапазоне концентраций 1-30 нмоль/кг при внутривенном введении эндоморфинов [263]. У кошек было выявлено двухфазное изменение системного АД при внутривенном введении эндогенных пептидов в диапазоне концентраций 1-30 нмоль/кг. Двухфазные реакции характеризовались начальным увеличением с последующим снижением системного АД [118]. По мнению ряда авторов, вазодилаторные реакции, вызванные эндоморфинами, опосредовались активацией налоксон-чувствительного ОР и стимуляцией высвобождения NO из эндотелия [148].

1.2.3. Динорфины – эндогенные неселективные агонисты опиоидных рецепторов

Впервые опиоидная природа динорфина А была описана Аврамом Гольдштейном и его коллегами [111]. Динорфин А – это эндогенный опиоидный пептид, который образуется из белка-предшественника продинорфина посредством фермента пропротеин-конвертазы 2. В результате протеолитического расщепления образуется динорфин А из 17 аминокислотных остатков, который является биологически активным пептидом. В периферической циркуляции динорфин А (1-17) подвергаются дальнейшему протеолитическому расщеплению с образованием N- и C-концевых фрагментов, таких как динорфин А (1–13) и динорфин А (1–8), которые сохраняют биологическую активность [222]. Аминокислотная последовательность динорфина А высококонсервативна и идентична у людей, крыс, мышей, крупного рогатого скота, свиней, а также у земноводных [138, 152].

В физиологических условиях динорфин А присутствует в крови в диапазоне 0,1–1,5 нМ [59, 246] и связывает κ-ОР с более высокой селективностью, чем μ-ОР или δ-ОР [88]. В повышенной концентрации динорфин А проявляет сродство к неопиоидным рецепторам, таким как брадикининовые рецепторы B2 [108] и рецепторы глутамата типа NMDA [94].

Динорфины, как эндогенные опиоиды, участвуют во множестве физиологических функций, включая антиноцицепцию и нейроэндокринную передачу сигналов [87]. Они контролируют процессы обучения, память, эмоции [234]. Кроме того, динорфины являются неотъемлемой частью системы реакции мозга на стресс, и высвобождение динорфинов происходит во время воздействия болезненных, ядовитых или стрессовых стимулов [87]. Исследования на грызунах показали, что стресс приводит к повышенному высвобождению динорфина А [102]. Кроме того, данные эндогенные опиоиды обладают антиаддиктивными свойствами, поскольку уменьшают поиск и потребление наркотиков [66]. Динорфины синтезируются клетками иммунной системы, высвобождаются под воздействием кортикотропин-рилизинг-фактора или IL-1 β (интерлейкина 1 β). Они модулируют пролиферацию, продукцию антител, поглотительную и секреторную активность клеток естественного иммунитета, проявляя как про-, так и противовоспалительную активность [9].

Известно, что динорфин А, как и другие эндогенные опиоиды, участвует в регуляции сердечно-сосудистых функций на уровне ЦНС и на периферическом уровне. Динорфин А экспрессируется в предсердиях и желудочках сердца [246], а к-ОР, располагающиеся на сарколемме, в ядрах и саркоплазматическом ретикулуме (СПР) кардиомиоцитов [52, 203], ко-локализованные с каналами Cav1.2 наружной плазматической мембраны и инвагинированными Т-каналцами, а также внутри клетки с рецепторами рианодина СПР [121], могут опосредовать эффект данного ОП. Мишель Дюмон с коллегами продемонстрировал, что динорфин А (1-13) может ингибировать сайт связывания убаина на Na⁺/K⁺-АТФ-азе, тем самым подавлять поглощение Na⁺ в кардиомиоцитах и вызывать нарушение сердечного ритма независимым от к-ОР способом [105]. При внутривенном введении крысам динорфина А проявляются как прессорные, так и депрессорные эффекты. Это зависит от состояния сознания животного, а полученные эффекты, вероятно, опосредуются как опиоидными, так и неопиоидными рецепторами [106]. Установлено, что динорфины способны

вызывать устойчивое сокращение церебральных артерий, а вазоконстрикция, вызванная динорфином А, по крайней мере частично, независима от κ-ОР [214].

1.2.4. β-эндорфин – эндогенный неселективный агонист опиоидных рецепторов

Одним из наиболее изученных представителей семейства эндорфинов является β-эндорфин –эндогенный опиоидный нейропептид и пептидный гормон, состоящий из 31 аминокислотного остатка, неселективный агонист ОР. β-эндорфин является наиболее активным и полифункциональным представителем пептидов группы предшественника проопиомеланокортина, и одним из трех эндорфинов, который вырабатывается в организме человека и секретируется в кровь при стрессе, шоке, травмах и физических нагрузках.

Особенностью β-эндорфина является его непостоянная концентрация в крови. Рядом авторов отмечены циркадные суточные колебания пептида [97, 171]. В норме уровень циркулирующего пептида достаточно низкий – порядка 10^{-12} - 10^{-10} М [4, 20, 269], однако под воздействием стресса происходит значительное увеличение концентрации β-эндорфина в крови и плазме. В зависимости от действующего фактора концентрация пептида может возрасть в 3-10 раз. Концентрация β-эндорфина в плазме повышалась в ответ на физические упражнения [233]. Также усиливал выброс β-эндорфина кратковременный иммобилизационный стресс [154], геморрагический шок [83], электро-болевое воздействие на конечности крыс [48], операционный стресс [268].

β-эндорфин, как эндогенный опиоид, участвует в регуляции множества физиологических функций. Обезболивающее (анальгезирующее) действие пептида осуществляется путем его связывания с μ-ОР на нейронах, участвующих в ноцицепции [140]. Кроме того, β-эндорфин обладает противошоковым, антистрессорным действием, показано его угнетающее действие на функцию гипоталамо-гипофизарной оси на всех её уровнях, возможно из-за ингибирования освобождения кортикотропин-рилизинг-фактора [233]. Применение β-эндорфина сопровождается понижением аппетита, торможением секреторной активности и

перистальтики ЖКТ, понижением тонуса симпатической нервной системы [146]. Установленный эффект осуществляется посредством активации μ -ОР энтеральных нейронов, что активирует несколько путей трансдукции, включая увеличение проницаемости K^+ -каналов, гиперполяризацию мембраны, уменьшение проводимости Ca^{2+} -каналов [289]. Установлено влияние β -эндорфина на иммунную систему, которое осуществляется путем взаимодействия пептида на поверхности Т-лимфоцитов с двумя типами рецепторов: при взаимодействии с ОР нейропептид оказывает ингибирующее действие на пролиферацию лимфоцитов; связываясь с неопиоидными рецепторами, он стимулирует Т-клеточное звено иммунитета [18]. β -эндорфин является одним из нейропептидов, связанных с состояниями удовольствия, такими как вызванная физическими упражнениями эйфория, секс, смех любовь и аппетит [86]. Облегчение боли, испытываемое в результате высвобождения β -эндорфина, было больше, чем у морфина [136].

1.2.5. Роль опиоидной системы в деятельности сердечно-сосудистой системы

Эндогенные опиоиды и рецепторы к ним идентифицированы в структурах сердечно-сосудистой системы (ССС). Исследования влияния ОП на ССС, продолжающиеся уже 3-е десятилетие, позволили установить, что клетки миокарда способны к синтезу, хранению и высвобождению ОП [27, 52, 70], а содержание ОП в миокарде сопоставимо с их уровнем в нейрональной ткани [178]. Хронология выявления ОР в структурах ССС также насчитывает более 30 лет. С. Вентура с соавторами установил локализацию κ - и δ -ОР на сарколемме кардиомиоцитов, при этом μ -ОР им обнаружить не удалось [211]. В более поздних работах другими авторами было подтверждено присутствие κ - и δ -ОР в кардиомиоцитах [58]. μ -ОР в этих исследованиях также не были обнаружены. Исследования Дж. Б. Стэфано с коллегами доказали присутствие μ -ОР на мембранах эндотелиальных клеток микрососудов крысы [220], а в ГМК сосудов были обнаружены δ -ОР [126]. Таким образом, долгое время предполагалось, что в кардиомиоцитах располагаются только κ - и δ -ОР, а μ -ОР отсутствуют. Однако в

2005 году Брайан Хед с соавторами с помощью метода иммунофлюоресцентной микроскопии обнаружили μ -ОР на сарколемме кардиомиоцитов крыс [139].

Организация взаимодействия опиоидных пептидов с ОР, расположенными в различных отделах миокарда, достаточно сложна. В ранних исследованиях было установлено, что агонисты δ - и κ -ОР вызывают угнетение сердечной деятельности [271]. В более поздних работах было показано, что U-50,488 – селективный агонист κ -ОР, дозозависимо снижал систолическое давление в левом желудочке и частоту сердцебиения *in vitro* и вызывал снижение АД и ЧСС *in vivo* [224]. Синтетический лиганд δ -ОР DPDPE вызывал кратковременную гипертензию при неизменной ЧСС [225]. В экспериментах на изолированных кардиомиоцитах желудочков было обнаружено, что δ - и κ -агонисты способны модулировать сократимость сердца [78]. Установленные эффекты κ - и δ -агонистов хорошо объяснялись наличием данных типов ОР на сарколемме кардиомиоцитов, поскольку κ - и δ -ОР ингибируют АЦ через активацию G_i -белков [23]. В то же время, изменение сократимости миокарда при действии ОП может быть обусловлено непрямыми, в частности, эндотелий-зависимыми механизмами, поскольку установлено, что μ -ОР экспрессируются на мембранах эндотелиальных клетках сосудов, в предсердиях, в подкожных венах и внутренних грудных артериях [78, 220].

Неселективность в отношении рецепторов, различие в локализации клеточных мишеней могут обуславливать различие в эффектах ОР на объекты ССС. Такое разнообразие эффектов ОП на сердечно-сосудистую систему дает право рассматривать их в качестве эндогенных модуляторов физиологических процессов в миокарде. Кроме того, в литературе описывается позитивная роль опиоидов в формировании адаптационной устойчивости сердца в ишемии-реперфузии [38, 52, 210], а также установлено участие АТФ-зависимых K^+ -каналов в повышении резистентности миокарда к реперфузионным повреждениям [200].

Влияние ОП на ЛС, в отличие от кровеносной системы, изучено существенно меньше. Так, имеются единичные работы, датированные 80-90-ми

годами прошлого века, по оценке эффектов эндогенных (лей- и мет-энкефалинов) и синтетических (даларгин) опиоидов на сократительную активность ЛС [15, 53, 54]. В современной литературе описаны результаты стимулирующего влияния синтетического ОП (ОП-171, аналог лей-энкефалина и даларгина, агонист δ -ОР) на лимфоток при острой тонкокишечной непроходимости и при остром отеке легких [49, 50].

ОП, являясь по своей химической структуре пептидами, попадают в системный кровоток посредством абсорбции в лимфатические капилляры из интерстиция. С учетом широты их функциональной активности можно предполагать, что, транспортируясь по ЛС, опиоиды могут выполнять ряд регуляторных функций, модулируя активный транспорт лимфы. Совокупность представленных данных предопределила обоснованность углубленного изучения влияния эндогенных ОП на сократительную активность ЛС, лежащую в основе активного транспорта лимфы, а также их механизмов действия на ЛС.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Выбор объекта исследования

В качестве объекта исследования использовали изолированные сегменты переднего брыжеечного лимфатического протока белой крысы. Брыжеечный лимфатический проток относится к сосудам мышечного типа, с высоким содержанием миоцитов в средней части мышечной манжетки и, в большинстве случаев (70%), с хорошо выраженной спонтанной сократительной активностью [3, 39, 85, 228]. Параметры сократительной активности брыжеечных лимфатических сосудов достаточно хорошо изучены [32, 85]. Раскрыты отдельные механизмы миогенной, гуморальной и нервной регуляции сократительной функции лимфатических сосудов данного типа [5, 39, 282]. При выборе брыжеечных ЛС в качестве объекта исследования принимался во внимание тот факт, что эндогенные опиоиды, в частности, β -эндорфин, синтезируются нейронами подслизистого и межмышечного сплетений кишечника и попадают в системный кровоток посредством абсорбции в лимфатические капилляры. При этом влияние эндогенных ОП, играющих выраженную роль в стресс-протективных реакциях организма, на структуры лимфатического русла представлено фрагментарно, как показано в обзоре литературы.

2.2 Приготовление препаратов для исследования

В экспериментах использовались ЛС половозрелых здоровых нелинейных белых крыс-самцов, возрастом 6 месяцев, массой 250-300 г, в количестве 142 штук, полученных из Филиала НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ – «Питомник лабораторных животных «Рапполово» (Ленинградская область) и прошедших карантин не менее 10–14 дней. Содержание и кормление лабораторных животных производилось в соответствии с ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными» от 2016 г. В помещениях для содержания животных контролировали параметры микроклимата

(температура, влажность, кратность воздухообмена), а также качество кормов и подстилочного материала. Животные получали стандартную диету, представленную в виде гранулированного корма. В помещениях, где содержались экспериментальные животные, был установлен режим освещения 12 ч день /12 ч ночь. Исследование выполнено в соответствии с правилами биоэтики, утвержденными Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других целей и одобрено Локальной биоэтической комиссией ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России. Эвтаназию проводили углекислым газом, постепенно наполняя им камеру с животным. После эвтаназии животное помещалось в препаровальную ванночку, конечности фиксировались для предотвращения сдвига при вскрытии брюшной полости. При выполнении широкого доступа использовался срединный разрез по белой линии живота. После наложение лигатуры у корня брыжейки тонкой кишки, последняя вырезалась и помещалась в используемую для препаровки специальную чашку Петри (DMT, Дания), заполненную оксигенированным раствором, непосредственно в которой, с использованием микроскопа МСП-1 (ЛОМО), проводилось выделение переднего брыжеечного лимфатического протока. В ходе препаровки из центральной части мышечной манжетки ЛС вырезали 2 – 4 кольцевых сегмента длиной $1,5 \pm 0,2$ мм каждый, которые помещались в рабочую камеру миографа (рисунок 2.1) с предварительно приготовленным оксигенированным раствором Кребса комнатной температуры. Временной промежуток между выделением сосудов и их помещением в рабочую камеру составлял не более 20 минут.

2.3 Солевые растворы: состав, температура, оксигенация, рН

Эксперименты проводили при непрерывном протоке физиологического солевого раствора Кребса следующего состава (в мМ): NaCl – 118,99; KCl – 4,69; NaHCO₃ – 25,0; KH₂PO₄ – 1,18; MgSO₄×7H₂O – 1,17; CaCl₂×2 H₂O – 2,5; EDTA – 0,03; C₆H₁₂O₆ – 5,5), подогретым до $37,2 \pm 0,2$ °C. Перед использованием

приготовленный раствор аэрировали газовой смесью, содержащей 5%CO₂ и 95%O₂, pH – 7,4±0,2. Контроль pH раствора осуществлялся с помощью pH-метра-213 (Hanna Instruments, Inc). Непрерывная суперфузия физиологическим раствором обеспечивалась многоканальным перистальтическим насосом Peristaltic Pump Drive BT100-1L (Рисунок 2.1).

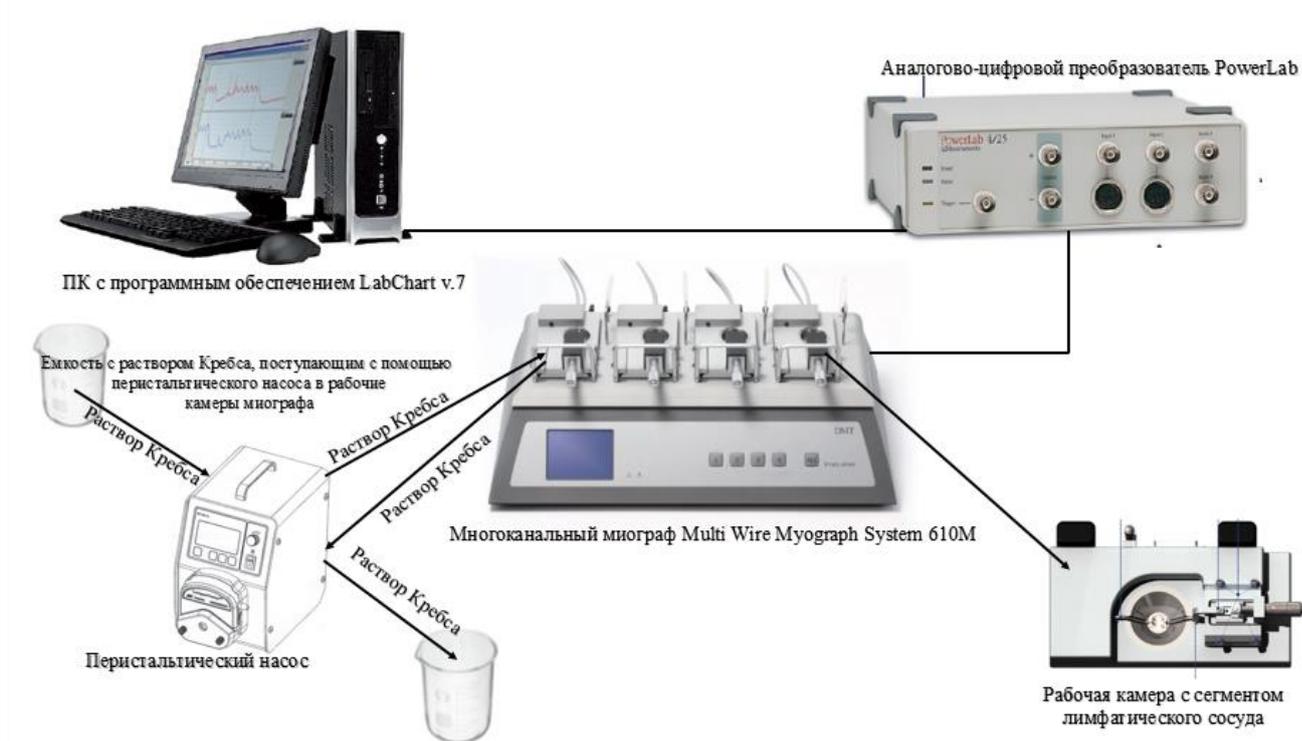


Рисунок 2.1 – Схема экспериментальной установки

Биологически активные и тестовые вещества растворяли в растворе Кребса за 10–15 мин до начала воздействия. Нерастворимые в воде вещества, такие как глибенкламид, CP-96345, предварительно растворяли в DMSO (dimethyl sulfoxide). Маточный раствор, содержащий препараты в концентрации 10⁻² М, добавляли в раствор Кребса до достижения его необходимой (тестируемой) концентрации.

2.4 Фармакологические препараты, используемые для воздействия на сегменты лимфатических сосудов

Для выявления эффектов эндогенных опиоидов на ЛС и изучения механизмов их действия на клеточную мембрану и внутриклеточные сигнальные системы в исследованиях использовали следующие препараты:

1. 4-аминопиридин – 4-AP (Sigma Aldrich, США) – блокатор потенциал-чувствительных K^+ -каналов. Использовался в концентрации 1×10^{-6} М.
2. DAMGO – [D-Ala², N-MePhe⁴, Gly-ol]-энкефалин (Sigma Aldrich, США) – синтетический агонист μ -опиоидных рецепторов. Использовался в диапазоне концентраций 1×10^{-11} – 1×10^{-7} М.
3. DMSO – dimethyl sulfoxide (Sigma Aldrich, США) – применялся как эмульгатор, растворитель для водонерастворимых веществ.
4. DADLE – [D-Ala², D-Leu⁵]-энкефалин (Sigma Aldrich, США) – синтетический агонист δ -опиоидных рецепторов. Использовался в диапазоне концентраций 1×10^{-11} – 1×10^{-7} М.
5. L-NAME – N-nitro-L-arginine methyl ester (BioMed, США) – блокатор NO-синтазы. Использовался в концентрации 1×10^{-6} М.
6. nor-Binaltorphimine – nBNI (Sigma Aldrich, США) – селективный антагонист κ -опиоидных рецепторов. Использовался в концентрации 1×10^{-6} М.
7. Ruthenium red (Sigma Aldrich, США) – блокатор рианодиновых рецепторов саркоплазматического ретикулума, ингибитор внутриклеточного кальция. Использовался в концентрации 1×10^{-6} М.
8. U-69593 (Sigma Aldrich, США) – синтетический агонист κ -опиоидных рецепторов. Использовался в диапазоне концентраций 1×10^{-11} – 1×10^{-7} М.
9. β -эндорфин (Sigma Aldrich, США) – эндогенный опиоид, неселективный агонист опиоидных рецепторов. Использовался в диапазоне концентраций 1×10^{-12} – 1×10^{-8} М.

10. Гепарин (Sigma Aldrich, США) – блокатор IP_3 -активируемых кальциевых каналов. Использовался в концентрации 5 ЕД/мл.
11. Глибенкламид – Glb (Sigma Aldrich, США) блокатор АТФ-чувствительных K^+ -каналов. Использовался в концентрации 1×10^{-5} М.
12. Динорфин А (Sigma Aldrich, США) – эндогенный опиоид, неселективный агонист опиоидных рецепторов. Использовался в диапазоне концентраций 1×10^{-12} – 1×10^{-8} М.
13. Налоксона гидрохлорид (Sigma Aldrich, США) – неселективный антагонист опиоидных рецепторов. Использовался в концентрации 1×10^{-6} М.
14. Налтриндол (Sigma Aldrich, США) – селективный антагонист δ -опиоидных рецепторов. Использовался в концентрации 2×10^{-7} М.
15. CP-96345 (Sigma Aldrich, США) – селективный антагонист NK-1 рецепторов. Использовался в концентрации 1×10^{-6} М.
16. СТОР (Sigma Aldrich, США) – селективный антагонист μ -опиоидных рецепторов. Использовался в концентрации 1×10^{-7} М.
17. Эндоморфин–1 (Sigma Aldrich, США) – эндогенный опиоид, агонист μ -опиоидных рецепторов. Использовался в диапазоне концентраций 1×10^{-12} – 1×10^{-8} М.

2.5 Регистрация сократительной активности

Изолированные сегменты ЛС после выделения помещали в рабочие камеры многоканального проволочного миографа Multi Wire Myograph System 610M (DMT, Дания), которые заполнялись физиологическим раствором при температуре $37,2 \pm 0,2^\circ\text{C}$ (Рисунок 2.1). Для формирования исходного уровня тонического напряжения ЛС, соответствующего гидродинамическим условиям в брыжеечных ЛС, проводилась процедура нормализации. Суть процедуры заключается в пошаговом увеличении натяжения кольцевых сегментов ЛС на 0,3 мН, ответной реакцией на которое является их расслабление, что отражает

пластичность гладких мышц. Натяжение кольцевых сегментов (в среднем до 1,5 – 1,8 мН) производили до появления устойчивых фазных сокращений. После стабилизации параметров сократительной активности, составляющей от 30 до 60 минут, проводилась регистрация исходных параметров лимфангионов, работающих в изометрическом режиме: частоты и амплитуды фазной активности, уровня тонического напряжения. Полученные параметры принимались за фоновые.

Регистрируемые параметры фазной сократительной активности (частота и амплитуда одиночных сокращений), хотя и являются показателями, отражающими в целом реактивность ЛС при действии биологически активных веществ и изменениях условий среды (температура, рН и др.), в полной мере не отражают насосную функцию ЛС и объем лимфы, перекачиваемый лимфангионами, поскольку продолжительность одиночных сокращений и их динамика существенно варьируют (Рисунки 1.6, 1.7, 1.8). Ввиду разнообразной формы и характера сокращений ЛС, опосредованно оценить производительность лимфангионов достаточно сложно. Для оценки насосной функции ЛС нами был предложен интегральный показатель – минутная производительность, который рассчитывался как площадь под кривой (AUC – area under the curve) за единицу времени и, на наш взгляд, наиболее адекватно отражает мощность сокращения. Расчет минутной производительности ЛС происходит с использованием программного обеспечения миографической аппаратуры LabChart v.7 (Рисунки 2.2, 2.3). Предложенный способ расчета позволяет оценить мощность сокращения, что косвенным образом иллюстрирует эффективность пропульсивной функции, в том числе в условиях меняющегося тонуса ГМК.

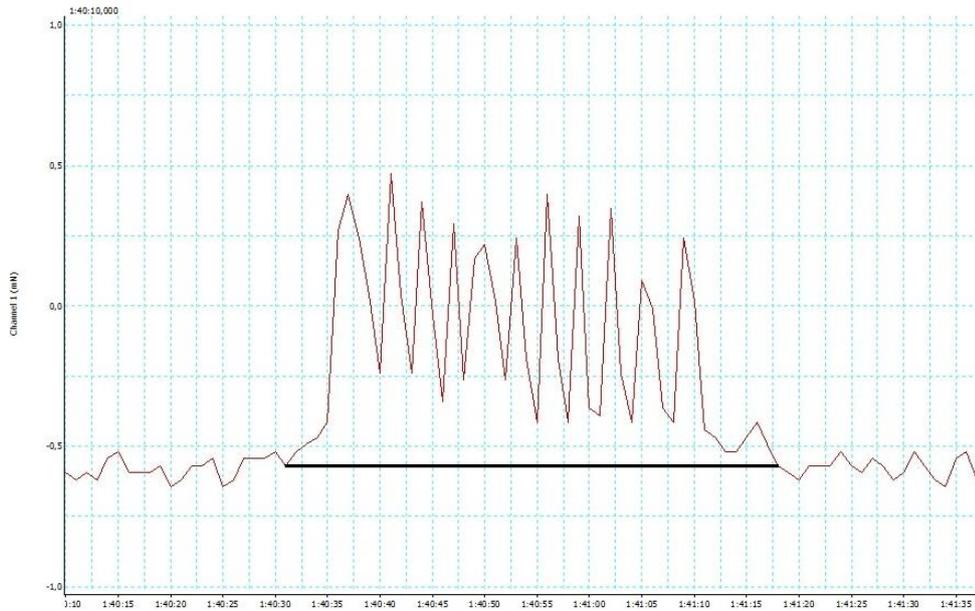


Рисунок 2.2 – Одиночное сокращение брыжеечного лимфатического сосуда крысы. Разработан автором



Рисунок 2.3 – Пример расчета минутной производительности (как площадь под кривой) фазных сокращений брыжеечных лимфатических сосудов крысы. Разработан автором

Эксперименты проводили на сегментах ЛС (лимфангионах), у которых была хорошо выражена фазная активность. После стабилизационного периода и регистрации исходного уровня сократительной активности ЛС, в перфузат добавляли исследуемые вещества, предварительно доведенные до требуемой концентрации в растворе Krebsa. Время экспозиции в каждой концентрации

составляло 10 минут, что определяется скоростью формирования сосудистых реакций на действие вазоактивной субстанции, к числу которых относятся регуляторные пептиды.

Поскольку параметры фазной активности ЛС характеризуются большой вариабельностью, при анализе влияния изучаемых веществ использовали относительные единицы, характеризующие динамику частоты, амплитуды фазной активности, изменение сосудистого тонуса лимфангионов и минутной производительности по сравнению с фоновыми значениями.

2.6 Методика тренировки животных на тредбане

Тренировка крыс проводилась на тредбане – установке для тренировки и тестирования степени усталости животных (беговая дорожка) с электростимуляционной площадкой (PanLab, Испания) и включала в себя подготовительный этап и собственно тренировку. Подготовительный этап длился с 1-го по 3-й дни эксперимента, в течение которого животных адаптировали к бегу на тредбане. Условия нагрузки: скорость движения ленты тредбана 0,38 м/с при угле ее подъема 20°, продолжительность 10 минут. Стимулом, побуждающим животных выполнять нагрузочное тестирование, являлась реакция избегания удара электрическим током (40 В) при замедлении бега или остановке животного. На 4-й день животные подвергались тестовой нагрузке – бегу по ленте тредбана при угле её наклона 20° и скорости движения 0,45 м/с, после чего проводили расчет индекса «Активности» – А. При этом, регистрируемым показателем являлось время активного бега животного по ленте тредбана в период с окончания 3-й до окончания 15-й минут тестирования при скорости ленты 0,45 м/с и угле подъема 20°, выраженное в процентах по отношению к общему времени непрерывного наблюдения (12 минут, или 720 с). Величина «Активности» рассчитывалась по формуле (1):

$$A = \frac{\sum T_{бега}}{\sum T_{общ}} \times 100\% \quad (1),$$

где $T_{бега}$ – время выполнения животным активного бега за оцениваемый период времени, секунды;

$T_{общ}$ – продолжительность оцениваемого периода выполнения физической нагрузки, секунды.

В эксперимент отбирались животные, у которых в течение 3 суток удавалось выработать устойчивый навык бега на тредбане и индекс «Активности» был не менее 50%, а к концу тренировочного цикла (21 день) достигал не менее 95%. С 5-го дня начинался основной этап тренировки, при котором животные подвергались ежедневным забегам (кроме выходных дней) в течение трех недель при угле наклона ленты беговой дорожки 20° , ее скорости 0,45 м/с и продолжительности 15 минут. Данные параметры тренировки наиболее адекватно характеризуют подготовку к нагрузкам в зоне аэробной мощности, что, согласно имеющимся литературным данным, является фактором, способствующим повышению уровня эндогенных опиоидов, в частности, β -эндорфина, в крови [62, 218]. На 22-й день исследования животные выполняли бег до полного утомления при скорости движения ленты 60 см/с, после чего использовались в эксперименте.

2.7 Характеристика экспериментального материала, объем исследований и статистическая обработка результатов

Работа выполнена на изолированных брыжеечных сегментах ЛС крысы, длина которых составляла $1,5 \pm 0,2$ мм. Из 142 ЛС было приготовлено 425 сосудистых сегмента, из них 63 препарата были приготовлены из ЛС, извлеченных из крыс, подвергавшихся физическим нагрузкам.

Статистическую обработку данных проводили с помощью методов описательной и аналитической статистики с использованием программы GraphPad Prism 5.04. За критический уровень значимости принимался $p \leq 0,05$. Для описания центральной тенденции использовалось значение среднего арифметического, в качестве меры рассеяния – величина стандартного отклонения. Нормальность

распределения выборки оценивали с помощью критерия Колмогорова-Смирнова, существенность различия дисперсий – с помощью критерия Фишера. При нормальном распределении и не существенных различиях дисперсий отличия в выборках оценивали с помощью t-критерия Стьюдента.

ГЛАВА 3. ВЫЯВЛЕНИЕ ОПИОИДНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В ЛИМФАТИЧЕСКИХ СОСУДАХ С ПОМОЩЬЮ СИНТЕТИЧЕСКИХ АГОНИСТОВ ОПИОИДНЫХ ПЕПТИДОВ

Основной спектр биологического действия эндогенных опиоидов реализуется посредством их взаимодействия с ОР. Согласно имеющимся сведениям, ОР экспрессируются на клетках многих тканей и органов, но их содержание варьирует в широких пределах и зависит от интенсивности транскрипции соответствующих генов [16, 48]. Максимальная плотность ОР обнаруживается в структурах мозга, ответственных за проведение и восприятие боли: задних рогах спинного мозга, сером веществе околосинаптического пространства, ядрах таламуса [185]. В 90-е годы прошлого столетия было установлено, что в кардиомиоцитах синтезируются энкефалины, динарфины и эндорфины [274], при этом содержание ОП в кардиомиоцитах сопоставимо с их уровнем в нейрональной ткани [178]. На сарколемме кардиомиоцитов желудочков и предсердий крыс обнаружены δ - и κ -ОР, что объясняет модулирующее влияние δ - и κ -агонистов на сократимость миокарда [275].

Относительно недавно мембраноселективные сайты связывания μ -ОР были обнаружены в миокарде левого желудочка крыс, а именно на клеточной мембране, СПР и митохондриях кардиомиоцитов, хотя их количество и ниже, чем δ - и κ -ОР [121]. Кроме этого, μ - и κ -ОР обнаружены в стенке ЖКТ, преимущественно в начальных отделах кишечника, δ -ОР локализованы в нейронах мезентериальных и субмукозных узлов [101].

В объектах сосудистого русла ОР были выявлены несколько позже, причем экспрессия μ -ОР была установлена только в эндотелиоцитах коронарных сосудов [78]. Экспрессия ОР в брыжеечных ЛС, имеющих тесную функциональную связь с кишечником, до настоящего времени не исследована. Следует отметить, что секретируемые в интерстиций ОП транспортируются в системный кровоток с лимфой посредством их первоначальной абсорбции в лимфатических капиллярах. Их влияние на сократительную способность ЛС представляется весьма

вероятным, с учетом выявленного модулирующего влияния опиоидных агонистов на сократимость кардиомиоцитов, имеющих существенное морфофункциональное сходство и общность регуляторных механизмов с ЛС. В экспериментах с использованием селективных антагонистов ОР и благодаря выделению мРНК транскриптов, были обнаружены участки связывания опиоидов на поверхности моноцитов и лимфоцитов человека, мыши, нейтрофилах крыс [241]. Обнаружено стимулирующее влияние β -эндорфина на пролиферацию лимфоцитов [8], которые являются частью клеточного пула лимфы и способны секретировать широкий спектр про- и противовоспалительных цитокинов. В свою очередь, цитокины могут выполнять роль активатора секреции ОП. Так, интерлейкин- 1β (IL- 1β) стимулировал выделение динорфина А и мет-энкефалина из лимфоцитов [181], а локальное введение IL- 1β в область воспаления стимулировало выделение мет-энкефалина, динорфина А и β -эндорфина [231]. Показана способность β -эндорфина стимулировать продукцию IL- 1β макрофагами мыши [16]. Установлено тормозное влияние приведенных цитокинов на моторику ЛС и узлов [51]. Широкий спектр физиологических реакций, вызываемых опиоидными пептидами, прямо или опосредованно, в различных структурах (звеньях) лимфатической системы, явился предпосылкой для проведения исследований по оценке влияния ОП на лимфатические сосуды.

В данной главе приводятся результаты исследований, целью которых явилась оценка реактивности брыжеечных ЛС на действие селективных агонистов ОР.

Исследования проводились на интактных изолированных сегментах лимфатического брыжеечного ствола крысы, обладающих спонтанной активностью. После стабилизации, регистрировались следующие параметры сократительной активности ЛС: частота фазных сокращений, которая составила $8,02 \pm 0,78 \text{ min}^{-1}$, амплитуда сокращений – $0,73 \pm 0,09 \text{ mN}$, минутная производительность регистрировалась на уровне – $104,19 \pm 15,39 \text{ у.е}$, тоническое напряжение – $0,79 \pm 0,10 \text{ mN}$. Так как параметры фазной активности ЛС характеризовались значительной вариабельностью, при анализе влияния

изучаемых веществ использовали относительные единицы, характеризующие динамику регистрируемых показателей.

Для выявления различных типов ОР в ЛС крысы использовались их селективные синтетические агонисты: DAMGO ([D-Ala², N-MePhe⁴, Gly-ol]-энкефалин) – агонист μ -ОР, DADLE ([D-Ala², D-Leu⁵]-энкефалин) – агонист δ -ОР и U-69593 – агонист κ -ОР. Поскольку известно, что под влиянием синтетических агонистов активируются внутриклеточные сигнальные пути, характерные для эндогенных опиоидов, [23, 64, 65] наличие реакций со стороны сократительной активности изолированных лимфангионов в ответ на воздействие опиоидных агонистов расценивалось в пользу экспрессии ОР в ЛС. Диапазон исследуемых концентраций был выбран на основании литературных данных о содержании эндогенных опиоидов в организме человека и животных [20, 59, 246, 260].

3.1 Сократительная активность лимфатических сосудов при действии селективного агониста μ -ОР DAMGO

Для выявления μ -ОР в брыжеечных ЛС крысы и оценки дозозависимости возможного вызываемого эффекта использовался агонист μ -ОР DAMGO в диапазоне концентраций $1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-7}$ М.

В результате проведенных экспериментов был выявлен угнетающий эффект DAMGO на сократительную активность ЛС крысы, который не зависел от концентрации агониста. Полученные данные представлены в Таблице 3.1.

Как следует из приведенных данных, при действии DAMGO во всем диапазоне тестируемых концентраций выявлено снижение параметров сократительной активности ЛС с максимальным снижением амплитуды сокращений на 13%, ЧС на 19 % и минутной производительности на 25% при действии агониста в концентрации 1×10^{-9} М ($p \leq 0,05$). Увеличение концентрации DAMGO не приводило к дальнейшему угнетению моторики ЛС. Тонус ЛС при действии агониста незначительно снижался (в пределах 3-8%) и это снижение было статистически незначимым. Обращает на себя внимание отсутствие прямой

зависимости между степенью изменений параметров фазной активности и минутной производительностью. В большинстве случаев, снижение минутной производительности более выражено, чем снижение частоты и амплитуды сокращений в той же концентрации, что указывает на плюсы примененного метода оценки эффективности сокращений.

Таблица 3.1 – Изменение сократительной активности лимфатических сосудов под действием агониста μ -ОР DAMGO. Данные представлены в относительных единицах по отношению к фону, $M \pm SD$, $n=9$

DAMGO, M	Частота сокращений	Амплитуда сокращений	Производительность	Тонус
1×10^{-11}	$0,97 \pm 0,06$	$0,94 \pm 0,02^*$	$0,91 \pm 0,05$	$0,95 \pm 0,03$
1×10^{-10}	$0,99 \pm 0,05$	$0,92 \pm 0,03^*$	$0,93 \pm 0,05$	$0,92 \pm 0,06$
1×10^{-9}	$0,81 \pm 0,06^*$	$0,87 \pm 0,03^*$	$0,75 \pm 0,06^*$	$0,97 \pm 0,08$
1×10^{-8}	$0,97 \pm 0,04$	$0,87 \pm 0,05^*$	$0,78 \pm 0,08^*$	$0,92 \pm 0,08$
1×10^{-7}	$0,96 \pm 0,05$	$0,88 \pm 0,05$	$0,78 \pm 0,09$	$0,93 \pm 0,09$
Примечание – * – статистически значимые различия по сравнению с фоновыми значениями при $p \leq 0,05$				

3.2 Сократительная активность лимфатических сосудов при действии селективного агониста δ -ОР DADLE

Для выявления δ -ОР в брыжеечных ЛС крысы и оценки дозозависимости возможного вызываемого эффекта использовался агонист δ -ОР DADLE в диапазоне концентраций 1×10^{-11} – 1×10^{-7} М. В результате проведенных экспериментов был выявлен незначительный угнетающий эффект DADLE на ЛС крысы, проявляющийся в снижении амплитуды сокращений на 4-7% в диапазоне концентраций 1×10^{-11} – 1×10^{-8} М ($p \leq 0,05$). Снижение показателя минутной производительности было зафиксировано в диапазоне концентраций 1×10^{-10} – 1×10^{-7} М, с максимумом 7% в концентрации 1×10^{-9} М, однако было статистически не значимым. При этом параметры ЧС сокращений практически не изменялись по сравнению с фоновыми показателями. Тоническое напряжение имело слабо выраженную тенденцию к дозозависимому увеличению, что могло явиться

причиной некоторого снижения минутной производительности ввиду неполного расслабления сосуда и, соответственно, неполного заполнения лимфангиона в диастолу. Полученные данные представлены в Таблице 3.2.

Таблица 3.2 Изменение сократительной активности лимфатических сосудов под действием агониста δ -OP DADLE. Данные представлены в относительных единицах по отношению к фону, $M \pm SD$

DADLE, M	n	Частота сокращений	Амплитуда сокращений	Производительность	Тонус
1×10^{-11}	8	$1,03 \pm 0,03$	$0,96 \pm 0,01^*$	$1,02 \pm 0,04$	$0,97 \pm 0,02$
1×10^{-10}	8	$0,98 \pm 0,04$	$0,96 \pm 0,02^*$	$0,97 \pm 0,07$	$0,97 \pm 0,08$
1×10^{-9}	8	$0,98 \pm 0,04$	$0,93 \pm 0,03^*$	$0,93 \pm 0,07$	$1,02 \pm 0,06$
1×10^{-8}	10	$0,96 \pm 0,03$	$0,93 \pm 0,02^*$	$0,95 \pm 0,06$	$1,04 \pm 0,07$
1×10^{-7}	14	$0,97 \pm 0,03$	$1,00 \pm 0,02$	$0,95 \pm 0,07$	$1,05 \pm 0,05$
Примечание – * – статистически значимые различия по сравнению с фоновыми значениями ($p \leq 0,05$).					

3.3 Сократительная активность лимфатических сосудов при действии селективного агониста к-ОР U-69593

Для выявления к-ОР в брыжеечных ЛС крысы и оценки дозозависимости возможного вызываемого эффекта использовался селективный агонист к-ОР U-69593 в диапазоне концентраций 1×10^{-11} – 1×10^{-7} М. В результате проведенных экспериментов было выявлено стимулирующее влияние агониста на сократительную активность брыжеечных ЛС крысы в диапазоне 10^{-10} – 1×10^{-8} М. Максимальный рост показателей регистрировался в концентрации 10^{-9} М, и для ЧС составил 13% от фона ($p \leq 0,05$), для минутной производительности – 20% ($p \leq 0,05$). Амплитуда сокращений, а также тоническое напряжение во всем диапазоне исследуемых концентраций менялись незначительно. Полученные данные представлены в Таблице 3.3.

Таблица 3.3 – Изменение сократительной активности лимфатических сосудов под действием агониста κ-опиоидных рецепторов U-69593. Данные представлены в относительных единицах по отношению к фону, $M \pm SD$

U-69593, M	n	Частота сокращений	Амплитуда сокращений	Производительность	Тонус
1×10^{-11}	8	$0,99 \pm 0,02$	$1,02 \pm 0,01$	$1,00 \pm 0,03$	$0,95 \pm 0,06$
1×10^{-10}	8	$1,12 \pm 0,04^*$	$1,01 \pm 0,02$	$1,15 \pm 0,06^*$	$0,99 \pm 0,07$
1×10^{-9}	8	$1,13 \pm 0,04^*$	$1,01 \pm 0,02$	$1,20 \pm 0,05^*$	$1,05 \pm 0,07$
1×10^{-8}	10	$1,11 \pm 0,04^*$	$1,03 \pm 0,01$	$1,13 \pm 0,08^*$	$1,02 \pm 0,03$
1×10^{-7}	10	$1,07 \pm 0,05$	$1,03 \pm 0,01$	$1,04 \pm 0,02$	$1,02 \pm 0,03$
Примечание – * – статистически значимые различия по сравнению с фоновыми значениями ($p \leq 0,05$)					

3.4 Обсуждение результатов

В литературе имеются данные, демонстрирующие, что ОП оказывают влияние на сократительную активность ЛС. В исследованиях, проведенных в 80-х гг. XX века с использованием лей- и мет-энкефалинов, было выявлено их разнонаправленное действие на сократительную активность ЛС. Лей-энкефалин вызывал активацию, либо торможение сократительной активности ЛС в зависимости от концентрации: так добавление $1,8 \times 10^{-5} M$ ОП вызывало прекращение спонтанных сокращений лимфангионов, а более низкие концентрации повышали сократительную активность ЛС. Действие мет-энкефалина (от $1,7 \times 10^{-5} M$ до $1,7 \times 10^{-6} M$) проявлялось в виде слабой активации спонтанной активности. Более низкие дозы мет-энкефалина эффекта не вызывали. Однако, механизмы действия ОП раскрыты не были [15, 53]. При этом, используемые в экспериментах концентрации энкефалинов значительно превышали их физиологический уровень в организме. Примерно в это же время проводились исследования влияния даларгина – синтетического аналога лей-энкефалина на микролимфоциркуляцию [53, 54]. В современной научной литературе имеются данные об изучении влияния опиоидного пептида-171 в дозе 40 мкг/кг в 1 мл физиологического раствора (агониста δ -ОР), синтезированного в Институте экспериментальной кардиологии ФГБУ НМИЦ кардиологии Минздрава России, на брыжеечный лимфоток. Было продемонстрировано его

стимулирующее воздействие на сократительную активность брыжеечных ЛС [50]. Эти данные можно расценивать, как косвенные доказательства присутствия ОР в структуре ЛС.

Эксперименты, проведенные с селективными агонистами ОР: DAMGO – агонистом μ -ОР, DADLE – агонистом δ -ОР и U-69593 – агонистом κ -ОР для выявления ОР в структуре брыжеечных ЛС, выявили изменения сократительной активности изолированных лимфангионов, что позиционировалось в пользу присутствия ОР в брыжеечных ЛС крысы.

DAMGO – агонист μ -ОР оказывал угнетающее влияние на сократимость брыжеечных ЛС. При этом наблюдалось снижение обоих регистрируемых параметров фазной активности, что приводило к уменьшению минутной производительности лимфангиона. Максимальный эффект регистрировался при его воздействии в концентрации 1×10^{-9} М. Полученные результаты представлены на Рисунке 3.1.

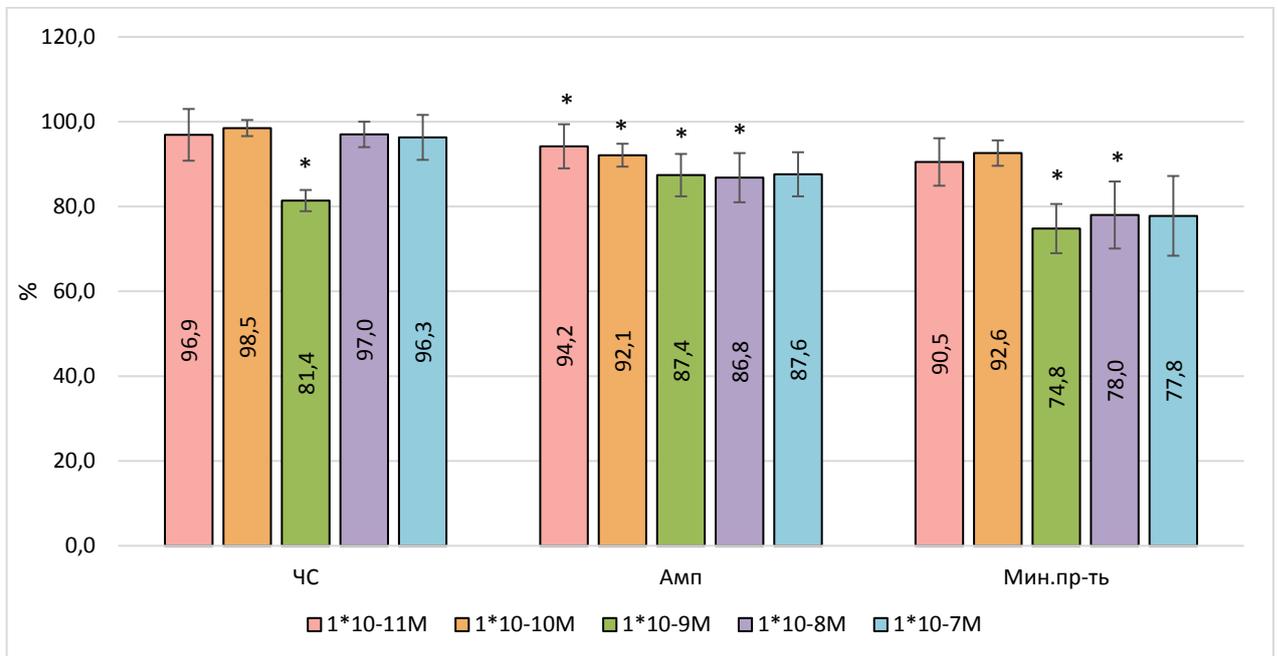


Рисунок 3.1 – Изменение сократительной активности ЛС под действием агониста μ -ОР DAMGO. Данные представлены в % по отношению к фону в виде $M \pm SD$. *, ** – статистически значимые различия по сравнению с фоновыми значениями ($p \leq 0,05$; $p \leq 0,01$)

DADLE – агонист δ -ОР также оказывал угнетающее влияние на сократительную активность ЛС, но менее выраженное, чем при воздействии DAMGO. Единственным достоверно изменяющимся при влиянии агониста параметром, являлась амплитуда сокращений (Рисунок 3.2). Наблюдаемый эффект при действии DADLE, проявляющийся в снижении силы сокращений, реализуется, вероятно, посредством его влияния на эффективность выхода кальция из внутриклеточных депо ЛС, что отражается в снижении объема перекачиваемой лимфы.

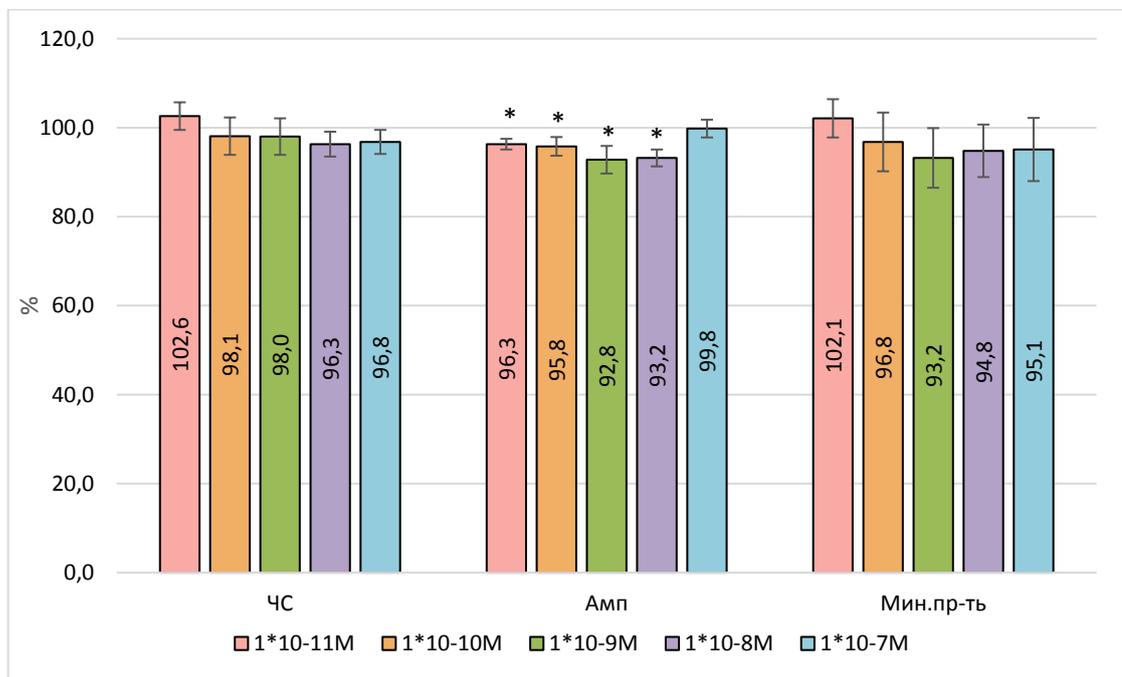


Рисунок 3.2 – Изменение сократительной активности ЛС под действием агониста δ -ОР DADLE. Данные представлены в % по отношению к фону в виде $M \pm SD$

Результаты, полученные при воздействии агониста κ -ОР U-69593 на ЛС, отличались от эффектов, вызываемых DAMGO и DADLE. U-69593 оказывал стимулирующее влияние на сократительную активность ЛС. Стимуляция моторики регистрировалась в диапазоне концентраций 10^{-10} – 10^{-8} М. Максимальный эффект регистрировался в концентрации 10^{-9} М, а при повышении концентрации стимулирующее действие агониста снижалось, хотя и было выше фоновых значений. Увеличение характеризовалось повышением ЧС, что

приводило к увеличению минутной производительности. В концентрации 10^{-9} М отмечался небольшой рост тонического напряжения, однако это увеличение было статистически не значимо. На амплитуду сокращений агонист к-ОР также оказывал стимулирующее влияние, однако оно было незначительно, по сравнению с ЧС и минутной производительностью (Рисунок 3.3).

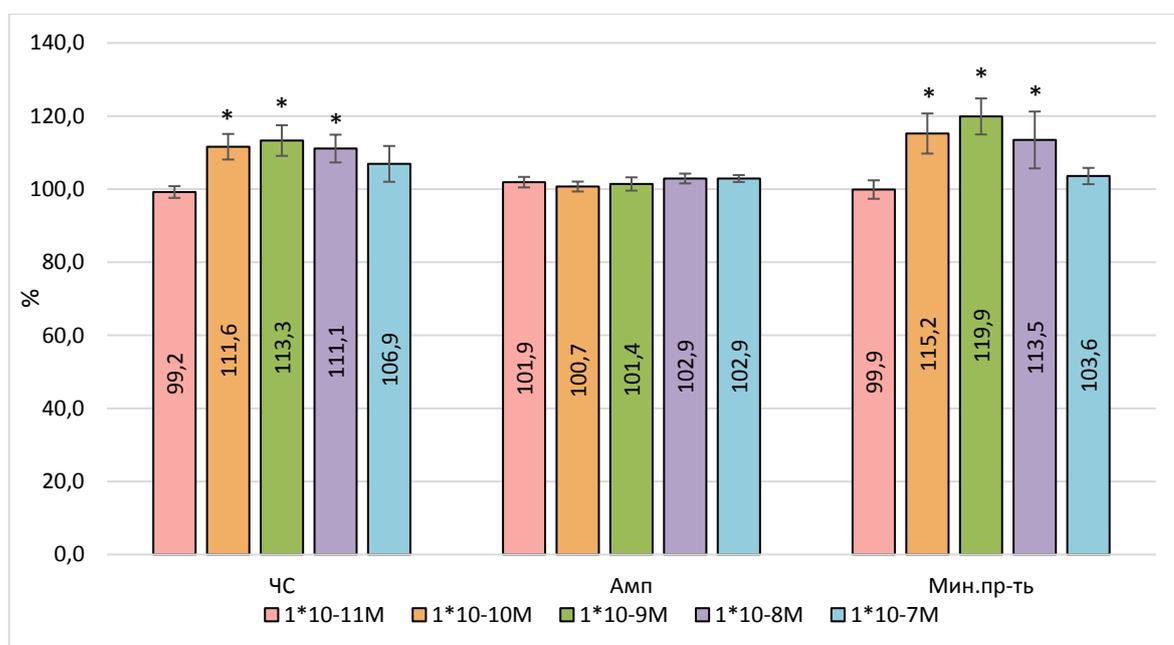


Рисунок 3.3 – Изменение сократительной активности ЛС под действием агониста к-ОР U-69593. Данные представлены в % по отношению к фону в виде $M \pm SD$

Согласно результатам исследований, проведенных на различных клеточных структурах и посвящённых выявлению сигнальных путей при действии опиоидов, стимуляция ОР вызывает их взаимодействие с ингибирующими G-белками, что приводит к закрытию потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов, стимуляции оттока K^+ из клетки, ведущей к гиперполяризации клеточной мембраны, а также снижению продукции ц-АМФ посредством ингибирования АЦ [179]. В целом, это приводит к снижению возбудимости клеток, и, как следствие, сократимости. Полученные результаты в отношении селективных агонистов μ - и δ -ОР были ожидаемыми, поскольку угнетение сократительной активности ЛС, зарегистрированное при действии DAMGO и DADLE, может объясняться описанными в литературе

тормозными эффектам μ - и δ -агонистов в силу определенного сходства механизмов, реализуемых в возбудимых клетках [179, 185]. Это дает основание предположить, что μ - и δ -ОР в брыжеечных ЛС крысы реализуют свое действие через вышеизложенные механизмы. Результаты, полученные при влиянии агониста к-ОР, в определенной степени оказались неожиданными, поскольку по литературным данным известно, что активация к-ОР приводит к реализации одного из «классических» механизмов, а именно – снижению содержания внутриклеточного кальция, в результате блокирования потенциал-зависимых Ca^{2+} каналов [166]. Это должно было привести к снижению сократительной активности при воздействии агониста на ЛС. В нашем же случае наблюдалось стимулирующее влияние U-69593 на моторику лимфангионов. В литературе имеются данные о том, что активация к-ОР вызывает мобилизацию внутриклеточного кальция в миоцитах желудочков крысы, что приводит к увеличению внутриклеточного пула Ca^{2+} [169], высвобождая внутриклеточные депо путем активации фосфолипазы С, которая, в свою очередь индуцирует образование вторичных мессенджеров IP_3 и ДАГ [164]. Полученный эффект также может быть объяснен активацией различных сигнальных каскадов: рецептор способен существовать в нескольких состояниях, и агонисты могут инициировать выборочную конформацию белка, который, в свою очередь, участвует в определенной сигнализации и регуляторных реакциях рецепторов – «многомерная эффективность рецептора» [167]. Доминирующий сигнальный путь определяется соотношением активных конформаций рецептора после связывания с агонистом, каждая из которых опосредует трансдукцию сигнала через определенный сигнальный каскад. Это соотношение зависит от времени нахождения GPCR в той или иной активной конформации, что, в свою очередь, определяется ее относительной стабильностью. Снижение стабильности одних активных конформаций приводит к повышению доли других и, как следствие, вызывает перераспределение интенсивности сигнальных путей в клетке. В большинстве случаев лиганды ортостерического сайта GPCR стабилизируют не одну, а несколько активных конформаций, соотношение которых зависит от

микроокружения рецептора, особенностей его структуры, а также доступности и функциональной активности нижележащих звеньев сигнальных каскадов [1]. Также продемонстрирована возможность гетеродимеризации ОР, при которой внутриклеточный механизм трансдукции сигнала, а соответственно и эффект, отличаются от эффекта одиночного рецептора. Так, отдельно μ - или δ -рецептор, действуя через $G_{\alpha i/o}$, угнетают Ca^{2+} -канал и аденилатциклазу, активируют K^+ -канал, что способствует снижению возбудимости клетки. Гетеродимер в этих условиях трансдуцирует сигнал через $G_{\alpha q}$ -субъединицу, активируя фосфолипазу С и повышая концентрацию внутриклеточного Ca^{2+} , что приводит к повышению функциональной активности клетки [103, 144]. Очевидно, стимулирующий эффект U-69593 в брыжеечных ЛС крысы обусловлен активацией фосфолипазного (фосфотидилинозитольного) сигнального пути, в результате чего повышается концентрация внутриклеточного Ca^{2+} и активируется протеинкиназа С и, как следствие, повышается функциональная активность гладкомышечных клеток брыжеечных ЛС.

Таким образом, в ходе экспериментальных исследований выявлена разнонаправленная реактивность брыжеечных ЛС крысы при действии селективных агонистов ОР, которая говорит о множественных сигнальных механизмах, вовлекаемых в реализацию биологического эффекта опиоидов. Результаты экспериментов с применением селективных агонистов ОР могут служить подтверждением присутствия рецепторов в брыжеечных ЛС крысы.

ГЛАВА 4. ВЛИЯНИЕ ЭНДОГЕННЫХ ОПИОИДОВ НА СОКРАТИТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ЛИМФАТИЧЕСКИХ СОСУДОВ

Многообразные эффекты опиоидэргической системы реализуются посредством взаимодействия ОП со специфическими мембранно-связанными ОР, которые широко распространены в организме. Следует отметить, что ОП не обладают специфичностью для определенного подтипа ОР. Кроме того, ОП способны взаимодействовать с неопиоидными рецепторами, модулируя широкий спектр физиологических реакций посредством стимуляции различных сигнальных путей, многие из которых активируются и другими агонистами. Неопиоидные эффекты, реализуемые посредством активации этих рецепторов, в отличие от опиоидных, не отменяются налоксоном. То есть, многообразие реализуемых опиоидными пептидами эффектов имеет сложные и различные механизмы.

Выявленная в экспериментах реактивность лимфангионов на действие селективных агонистов ОР, результаты которых приведены в главе 3, неоднократно подтвержденная определенная общность регуляторных механизмов ЛС и миокарда, а также наиболее высокая вероятность абсорбции пептидных регуляторов из интерстиция в лимфатические капилляры послужили основанием для исследования по оценке влияния эндогенных опиоидов на моторику ЛС.

Эксперименты проводились на изолированных спонтанно активных сегментах лимфатического брыжеечного ствола интактных крыс. Раствор, содержащий эндогенные опиоиды, вводили в рабочую камеру физиологической установки через 30-45 минут стабилизационного периода после начала эксперимента, когда формировалась устойчивая спонтанная сократительная активность ЛС. Поскольку параметры фазной активности ЛС характеризовались большой вариабельностью, при анализе влияния изучаемых веществ использовали относительные единицы, характеризующие динамику регистрируемых показателей.

Было изучено влияние следующих эндогенных ОП: β -эндорфина, эндоморфина-1 и динорфина А. Диапазон исследуемых концентраций тестируемых веществ определялся на основании литературных данных о содержании эндогенных опиоидов в организме человека и животных [20, 59, 246, 260].

4.1. Сократительная активность лимфатических сосудов при действии β -эндорфина

β -эндорфин применяли в диапазоне концентраций 1×10^{-12} – 1×10^{-8} М. Выбранный диапазон концентраций включает в себя эндогенный уровень пептидного регулятора, представленный в литературе [4, 260]. В Таблице 4.1 приведены показатели сократительной активности ЛС после 10-минутной экспозиции раствора опиоида.

Таблица 4.1 – Изменение параметров сократительной активности изолированных ЛС под действием β -эндорфина. Данные представлены в относительных единицах по отношению к фону, $M \pm SD$, $n=8$

β -эндорфин, М	Частота сокращений	Амплитуда сокращений	Производительность	Тонус
1×10^{-12}	$0,99 \pm 0,04$	$1,01 \pm 0,03$	$0,90 \pm 0,05$	$0,98 \pm 0,04$
1×10^{-11}	$0,89 \pm 0,07$	$1,04 \pm 0,04$	$0,83 \pm 0,07^*$	$1,03 \pm 0,04$
1×10^{-10}	$0,83 \pm 0,07^*$	$1,06 \pm 0,05$	$0,80 \pm 0,03^*$	$0,99 \pm 0,04$
1×10^{-9}	$0,83 \pm 0,08^*$	$1,09 \pm 0,09$	$0,83 \pm 0,03^*$	$1,04 \pm 0,08$
1×10^{-8}	$0,78 \pm 0,10^*$	$1,06 \pm 0,08$	$0,81 \pm 0,06^*$	$1,08 \pm 0,12$

Примечание – * – статистически значимые различия по сравнению с фоновыми значениями ($p \leq 0,05$)

Согласно полученным результатам, пороговая концентрация β -эндорфина, вызывающая сосудистую реакцию, составила 10^{-11} М. В диапазоне концентраций 10^{-11} – 10^{-9} М влияние пептида приводило к малозависящему от концентрации снижению частоты фазной активности миоцитов (максимально до 17% от исходной величин, $p \leq 0,05$), сопровождающемуся сходным снижением производительности лимфангионов. Увеличение концентрации пептида до 10^{-8} М

сопровождалось бóльшим снижением частоты сокращений – максимально на 22% ($p \leq 0,05$). Основываясь на классических представлениях о внутрисердечных регуляторных механизмах, когда усиление сердечных сокращений связано с увеличенным кровенаполнением во период более продолжительной диастолы, зарегистрированная тенденция к увеличению амплитуда одиночных сокращений лимфангионов, вероятно, и является следствием бóльшего заполнения ЛС в диастолу при снижении частоты фазных сокращений. Тонические реакции ГМК ЛС во всем диапазоне тестируемых концентраций β -эндорфина были слабо выраженными, максимальное увеличение тонуса (на уровне тенденции) зарегистрировано при действии β -эндорфина в концентрации 10^{-8} М. Снижение минутной производительности ЛС составило в среднем 20% от фоновых значений, и было статистически значимым. Поскольку интегральный показатель – минутная производительность под действием β -эндорфина во всем диапазоне исследуемых концентраций снижался, и этот показатель коррелирует с частотой фазной активности ($r=0,80$), можно констатировать, что β -эндорфин оказывает угнетающее, тормозное влияние на сократительную активность брыжеечных ЛС крысы.

4.1.1. Изучение механизмов действия β -эндорфина на лимфатические сосуды крысы

Согласно литературным данным, β -эндорфин является неселективным агонистом ОР, обладающим системным действием на ряд функций организма. При этом, по мнению ряда авторов, наиболее выраженное действие пептид оказывает в условиях повышенного «возмущения» [20, 182]. Влияние β -эндорфина на сосуды лимфатической системы, равно как и сведения о наличии либо отсутствии μ -ОР на мембране ГМК сосудов, в доступной научной литературе не представлены. При этом известно, что на эндотелиальных клетках артерий, подкожной вены и микрососудах человека и крысы экспрессируются μ_3 - и δ_2 -ОР [220, 297], на ГМК – δ -ОР [126], а на мембране кардиомиоцитов

присутствуют все три типа ОР [139, 211]. В наших экспериментах, проведенных с применением селективного агониста μ -ОР DAMGO, было обнаружено тормозное влияние агониста на сократительную активность ЛС. Такое же влияние оказывал селективный агонист δ -ОР DADLE, хотя оно было наименее выражено. При воздействии агониста κ -ОР U-69593 зарегистрировано стимулирующее влияние на сократительную активность ЛС. Выявленная реактивность ЛС к воздействию агонистов ОР предполагает поиск сигнальных путей, лежащих в основе зарегистрированных изменений сократительной активности ЛС при влиянии β -эндорфина.

В данной части исследования, целью которой явилось выявление возможных рецепторов-мишеней и сигнальных путей, реализующих действие пептидного регулятора, β -эндорфин использовался в концентрации 1×10^{-9} М, соответствующей содержанию пептида в плазме крови в состоянии относительного покоя, при действии которой отмечалось достоверное субмаксимальное уменьшение минутной производительности лимфангионов (на 17% в сравнении с фоном).

Для выяснения возможных механизмов действия изучаемого пептида и участия ОР в их реализации были проведены эксперименты с селективными антагонистами ОР: СТОР – антагонист μ -ОР, налтриндол – антагонист δ -ОР, nBNI – антагонист κ -ОР.

Таблица 4.2 – Параметры сократительной активности изолированных ЛС при воздействии β -эндорфина на фоне СТОР. Данные представлены в относительных единицах в виде $M \pm SD$ по отношению к фону, $n=11$

ОП, блокатор ОР	Частота сокращений	Амплитуда сокращений	Производительность	Тонус
β -эндорфин, 1×10^{-9} М	$0,83 \pm 0,06^*$	$1,08 \pm 0,05$	$0,84 \pm 0,03^*$	$1,03 \pm 0,05$
СТОР+ β -эндорфин	$1,05 \pm 0,05\#$	$0,98 \pm 0,01$	$1,04 \pm 0,06\#$	$1,00 \pm 0,02$
Примечание – * – статистически значимые различия по сравнению с фоновыми значениями ($p \leq 0,05$); # – статистически значимые различия по сравнению с изолированным применением β -эндорфина ($p \leq 0,05$)				

Селективный антагонист μ -ОР СТОР использовался в концентрации 10^{-7} М, и в этой концентрации не вызывал статистически значимых изменений параметров сократительной активности ЛС. В Таблице 4.2 приведены результаты экспериментов по оценке параметров сократительной активности ЛС под влиянием β -эндорфина на фоне селективного блокатора μ -ОР.

Согласно полученным данным, на фоне селективного блокатора μ -ОР СТОР, примененного в концентрации 10^{-7} М, эффект β -эндорфина не проявлялся. Наблюдалась слабо выраженная тенденция к увеличению частоты сокращений и минутной производительности лимфангионов – на 5% и 4% соответственно по отношению к фоновым значениям. Полученная ответная реакция со стороны ЛС при влиянии β -эндорфина на фоне СТОР, которая не характерна для изолированного действия β -эндорфина, позволяет сделать заключение, что тормозное действие ОП может осуществляться посредством активации сигнальных путей, инициируемых при его взаимодействии с μ -ОР.

Следующая серия экспериментов проводилась с применением селективного антагониста δ -ОР налтриндола, который использовался в концентрации 2×10^{-7} М. Изолированное применение антагониста в данной концентрации не вызывало статистически значимых изменений параметров сократительной активности ЛС. β -эндорфин в данной части работы использовался также в концентрации 10^{-9} М. В Таблице 4.3 приведены результаты экспериментов по оценке параметров сократительной активности ЛС под влиянием β -эндорфина на фоне селективного блокатора δ -ОР.

Таблица 4.3 – Параметры сократительной активности изолированных ЛС при воздействии β -эндорфина на фоне налтриндола. Данные представлены в относительных единицах по отношению к фону в виде $M \pm SD$, $n=10$

ОП, блокатор ОР	Частота сокращений	Амплитуда сокращений	Производительность	Тонус
β -эндорфин, 1×10^{-9} М	$0,84 \pm 0,06^*$	$1,09 \pm 0,05$	$0,85 \pm 0,04^*$	$1,04 \pm 0,05$
налтриндол + β эндорфин	$0,98 \pm 0,03\#$	$1,01 \pm 0,01$	$0,95 \pm 0,08\#$	$0,99 \pm 0,01$

Примечание – * – статистически значимые различия по сравнению с фоновыми значениями ($p \leq 0,05$); # – статистически значимые различия по сравнению с изолированным применением β -эндорфина ($p \leq 0,05$)

Согласно полученным данным, тормозное влияние β -эндорфина на моторику ЛС на фоне антагониста δ -ОР не проявлялось, что может свидетельствовать об участии δ -ОР в реализации тормозного эффекта ОП.

Следующая серия экспериментов была проведена с селективным антагонистом κ -ОР – nBNI, поскольку, согласно современным литературным данным, ОП способны активировать передачу сигналов G-белка посредством взаимодействия со всеми типами ОР, хотя и с разной активностью [75]. В результате экспериментов обнаружено, что nBNI в концентрации 1×10^{-6} М обладает стимулирующим действием на сократительную активность ЛС, проявляющимся увеличением частоты сокращений и минутной производительности. β -эндорфин в данной части работы использовался также в концентрации 1×10^{-9} М. В Таблице 4.4 приведены результаты экспериментов по оценке параметров сократительной активности ЛС под влиянием β -эндорфина на фоне селективного блокатора κ -ОР.

Таблица 4.4 – Показатели сократительной активности изолированных ЛС крысы при действии β -эндорфина на фоне nBNI. Данные представлены в относительных единицах по отношению к фону в виде $M \pm SD$, $n=8$

ОП, блокатор ОР	Частота сокращений	Амплитуда сокращений	Производительность	Тонус
β -эндорфин 1×10^{-9} М	$0,85 \pm 0,07^*$	$1,07 \pm 0,06$	$0,84 \pm 0,03^*$	$1,03 \pm 0,04$
nBNI, 1×10^{-6} М	$1,13 \pm 0,03^{**}$	$0,96 \pm 0,03$	$1,11 \pm 0,08^*$	$1,01 \pm 0,01$
nBNI + β -эндорфин	$0,98 \pm 0,04^*$	$0,98 \pm 0,02$	$0,95 \pm 0,03^*$	$1,01 \pm 0,01$
Примечание – *, ** – статистически значимые различия по сравнению с фоновыми значениями ($p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$). Для экспериментов nBNI + β -эндорфин за фон принимался эффект изолированного применения nBNI				

Согласно полученным данным, тормозное влияние β -эндорфина на моторику ЛС на фоне антагониста κ -ОР сохранялось. При этом, снижение частоты сокращений ЛС составило 15% ($p \leq 0,05$), минутной производительности 16% ($p \leq 0,05$). Полученные результаты свидетельствуют о том, что реализация тормозного эффекта β -эндорфина на ЛС в состоянии относительного покоя осуществляется без участия κ -ОР. При этом важно отметить, что стимуляция

сократительной активности под влиянием селективного антагониста κ -ОР pVNI свидетельствует об экспрессии данного типа рецепторов в брыжеечных ЛС крысы.

На Рисунках 4.1, 4.2 и 4.3 представлены наиболее информативные показатели сократительной активности (ЧС и минутная производительность) ЛС при изолированном действии β -эндорфина, а также на фоне блокаторов ОР.

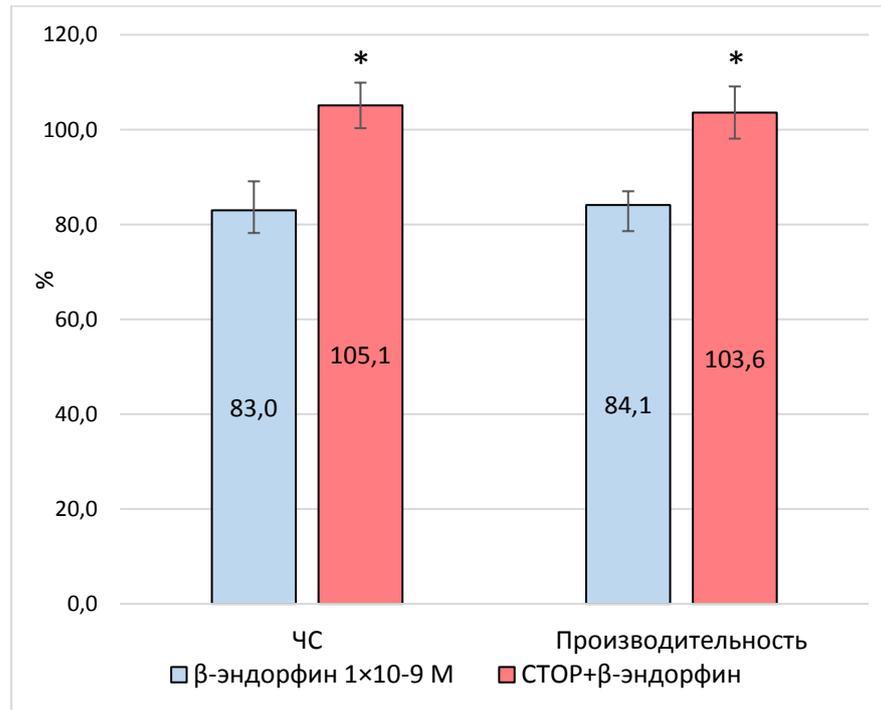


Рисунок 4.1 – Параметры сократительной активности изолированных ЛС при воздействии β -эндорфина на фоне блокатора μ -ОР СТОР. Данные представлены в % по отношению к фону. * – статистически значимые различия по сравнению с изолированным действием β -эндорфина ($p \leq 0,05$)

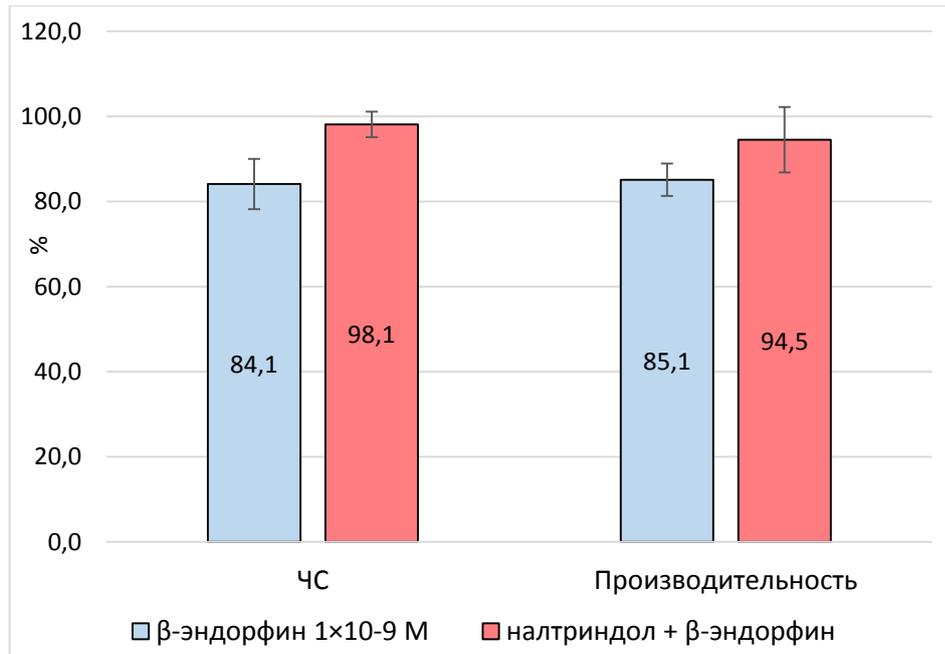


Рисунок 4.2– Параметры сократительной активности изолированных ЛС при воздействии β -эндорфина на фоне блокатора δ -ОР налтриндола. Данные представлены в % по отношению к фону

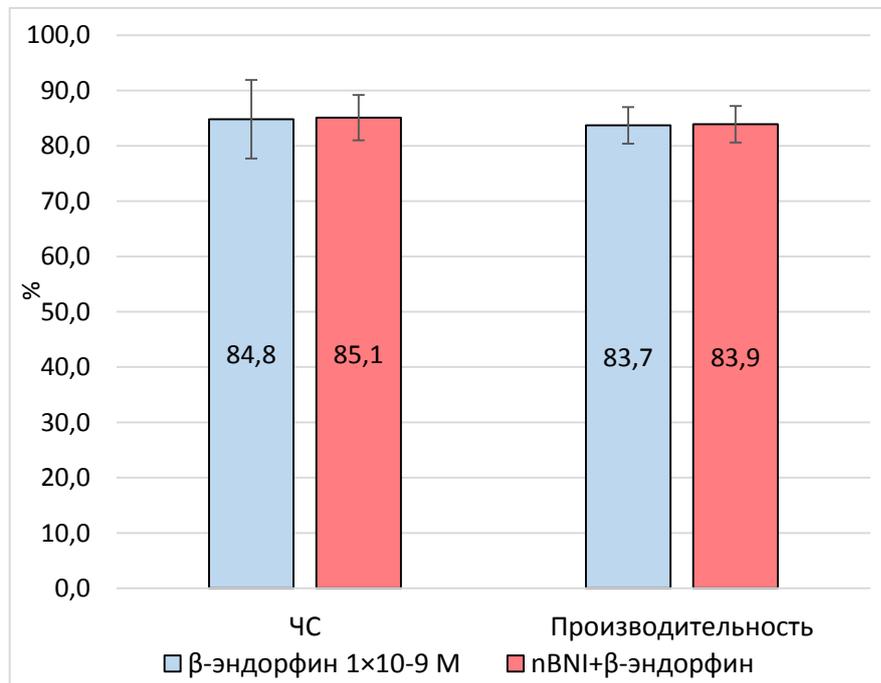


Рисунок 4.3– Параметры сократительной активности изолированных ЛС при воздействии β -эндорфина на фоне блокатора κ -ОР nBNI. Данные представлены в % по отношению к фону. Для экспериментов nBNI + β -эндорфин за фон принимался эффект изолированного применения nBNI

На основании полученных результатов можно сделать заключение, что в брыжеечных ЛС крысы β -эндорфин оказывает угнетающее влияние на моторику лимфангионов посредством активации μ - и δ -ОР, при этом κ -ОР в реализации полученного эффекта участия не принимают.

Механизмы трансформации сигнала после стимуляции ОР довольно сложные и могут реализовываться посредством активации нескольких сигнальных путей. Согласно литературным данным, эффекты агонистов ОР в клетках возбудимых тканей (кардиомиоцитах, нейронах ЦНС и миоэнтерального сплетения, миоцитах ЖКТ) [128, 146, 289] реализуются посредством изменения проницаемости K^+ -каналов, активации эндотелий-зависимых механизмов, изменения активности киназных каскадов, в частности, ERK-киназы и протеинкиназы C и др. Как отмечалось ранее, активация ОР специфическими агонистами вызывает увеличение проницаемости K^+ -каналов клеточных мембран посредством реализации связи рецепторов с G-белками [188]. Это дает основание предположить, что отмеченное в эксперименте уменьшение частоты фазной активности ЛС при действии β -эндорфина может быть следствием увеличения проницаемости K^+ -каналов плазматической мембраны, активируемых при взаимодействии β -эндорфина с ОР на поверхности ГМК, что вызывает гиперполяризацию мембраны и уменьшение возбудимости клеток. С целью определения возможного участия структур плазматической мембраны миоцита в зарегистрированном эффекте β -эндорфина проведено исследование с использованием блокаторов K^+ -каналов: 4-аминопиридина (4-AP) и глибенкламида (Glb). Результаты, отражающие эффект применения блокаторов, а также действие β -эндорфина в этих условиях, приведены в Таблицах 4.5. и 4.6.

В результате проведенных экспериментов установлено, что при применении блокатора потенциал-зависимых K^+ -каналов 4-AP в концентрации 1×10^{-6} М проявлялась слабо выраженная тенденция к увеличению ЧС и амплитуды ЛС на 6% и 4% соответственно, что, в совокупности, приводило к увеличению минутной производительности лимфангионов на 12%. Увеличение показателей сократительной активности ЛС, вероятно, связано с деполяризующим действием

4-AP, блокирующего спонтанно активный калиевый ток, частично ответственный за формирование мембранного потенциала покоя [248].

Таблица 4.5 – Параметры сократительной активности изолированных ЛС при воздействии β -эндорфина на фоне блокатора калиевых каналов 4-AP. Данные представлены в относительных единицах по отношению к фону в виде $M \pm SD$, $n=8$

ОП, блокатор K^+ -каналов	Частота сокращений	Амплитуда сокращений	Производительность	Тонус
β -эндорфин, 10^{-9} М	$0,83 \pm 0,05^*$	$1,08 \pm 0,08$	$0,84 \pm 0,05^*$	$1,04 \pm 0,07$
4-AP, 10^{-6} М	$1,06 \pm 0,03$	$1,04 \pm 0,06$	$1,12 \pm 0,05$	$0,98 \pm 0,02$
4-AP+ β -эндорфин	$0,95 \pm 0,06$	$1,05 \pm 0,04$	$1,10 \pm 0,06\#$	$0,82 \pm 0,06^*$
Примечание – * – статистически значимые различия по сравнению с фоновыми значениями ($p \leq 0,05$); # – статистически значимые различия по сравнению с изолированным применением β -эндорфина ($p \leq 0,05$). Для экспериментов 4-AP+ β -эндорфин за фон принимался эффект изолированного применения 4-AP				

Таблица 4.6 – Параметры сократительной активности изолированных ЛС при воздействии β -эндорфина на фоне блокатора калиевых каналов Glb. Данные представлены в относительных единицах по отношению к фону в виде $M \pm SD$, $n=12$

ОП, блокатор K^+ -каналов	Частота сокращений	Амплитуда сокращений	Производительность	Тонус
β -эндорфин, 1×10^{-9} М	$0,82 \pm 0,04^*$	$1,09 \pm 0,05$	$0,82 \pm 0,03^*$	$1,03 \pm 0,05$
Glb, 1×10^{-5} М	$1,05 \pm 0,04$	$0,96 \pm 0,03$	$1,09 \pm 0,06$	$1,04 \pm 0,02^*$
Glb+ β -эндорфин	$0,98 \pm 0,04$	$0,97 \pm 0,08$	$1,29 \pm 0,10^*\#$	$0,92 \pm 0,04^*$
Примечание – * – статистически значимые различия по сравнению с фоновыми значениями ($p \leq 0,05$); # – статистически значимые различия по сравнению с изолированным применением β -эндорфина ($p \leq 0,05$). Для экспериментов Glb + β -эндорфин за фон принимался эффект изолированного применения Glb				

В условиях применения блокатора потенциал-зависимых калиевых каналов 4-AP действие β -эндорфина, хотя и приводило к снижению частоты сокращений ЛС, но было менее выраженным в сравнении с изолированным его применением (на 11 и 17% соответственно). Амплитуда сокращений не претерпевала существенных изменений, равно как и минутная производительность. Обращает на себя внимание снижение тонуса ЛС: при действии β -эндорфина на фоне блокады потенциал-зависимых калиевых каналов регистрировали его снижение на 16%. Вероятно, исключение калиевых каналов из сигнального каскада

приводит к проявлению активности других механизмов, возможно, эндотелий-зависимых, влияющих на параметры сократительной активности при действии β -эндорфина. Таким образом, эффект β -эндорфина проявлялся на фоне блокатора потенциал-зависимых K^+ -каналов 4-AP, хотя и был менее выражен, по сравнению с его изолированным применением.

Сходные изменения сократительной активности ЛС были зарегистрированы при применении блокатора АТФ-чувствительных калиевых каналов Glb – выявлено увеличение ЧС на 5% по отношению к фону и, как результат, увеличение интегрального показателя на 9%. В отличие от эффекта 4-AP, амплитуда сокращений при действии Glb незначительно уменьшилась – на 4% по отношению к фону. Применение β -эндорфина на фоне Glb характеризовалось менее выраженным влиянием, чем при изолированном применении пептида: снижение частоты составило 7%, минутная производительность ЛС при этом возросла на 20% ($p \leq 0,05$).

Интересен факт, что параметры одиночных сокращений (амплитуда и частота сокращений) в условиях применения Glb менялись незначительно, тогда как интегральный показатель лимфангионов характеризовался выраженным достоверным увеличением. По нашему мнению, это связано с изменением формы сокращений, длительности сгруппированных сокращений (Рисунок 4.4), а также снижением тонуса (Таблица 4.6), что способствует лучшему наполнению лимфангионов в диастолу. В результате этого происходит увеличение «площади под кривой» – предложенного нами параметра, характеризующего минутную производительность ЛС (методика расчета представлена в главе 2). Этот пример ярко демонстрирует, что для адекватной оценки изменения сократительной активности ЛС под влиянием вазоактивных веществ таких показателей, как амплитуда и частота сокращений недостаточно, а предложенный нами показатель минутной производительности наиболее полно характеризует сократительную активность лимфангиона.

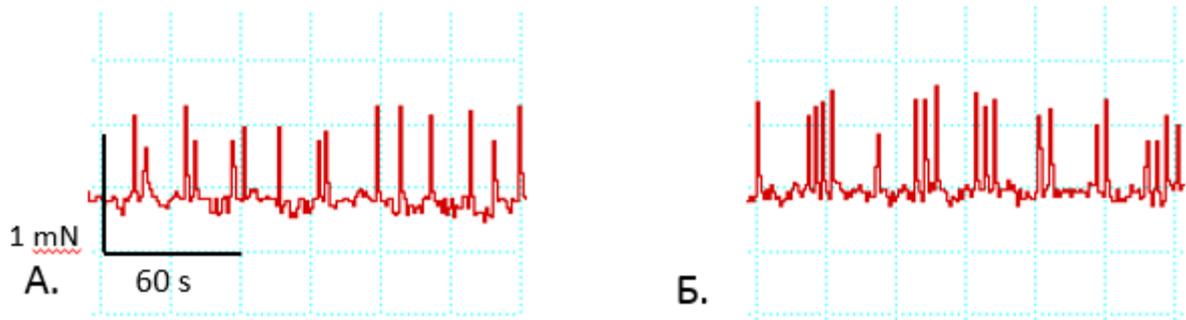


Рисунок 4.4 – А – кривая записи сократительной активности интактных ЛС (фон). Б – кривая записи сократительной активности ЛС при воздействии β -эндорфина на фоне Glb. Разработан автором. Пояснения в тексте

На Рисунках 4.5 и 4.6 представлены показатели сократительной активности ЛС при изолированном действии β -эндорфина, на фоне 4-AP, а также на фоне Glb.

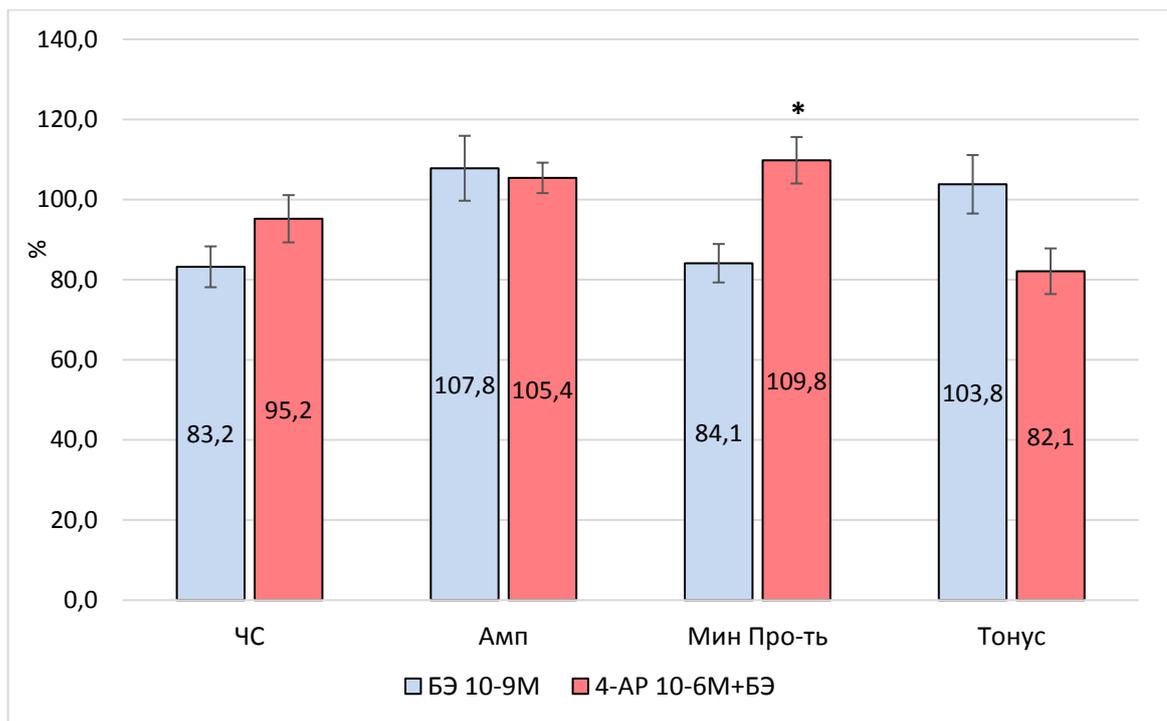


Рисунок 4.5 – Параметры сократительной активности изолированных ЛС при воздействии β -эндорфина на фоне 4-AP. Данные представлены в % по отношению к фону, * – статистически значимые различия по сравнению с изолированным применением β -эндорфина ($p \leq 0,05$)

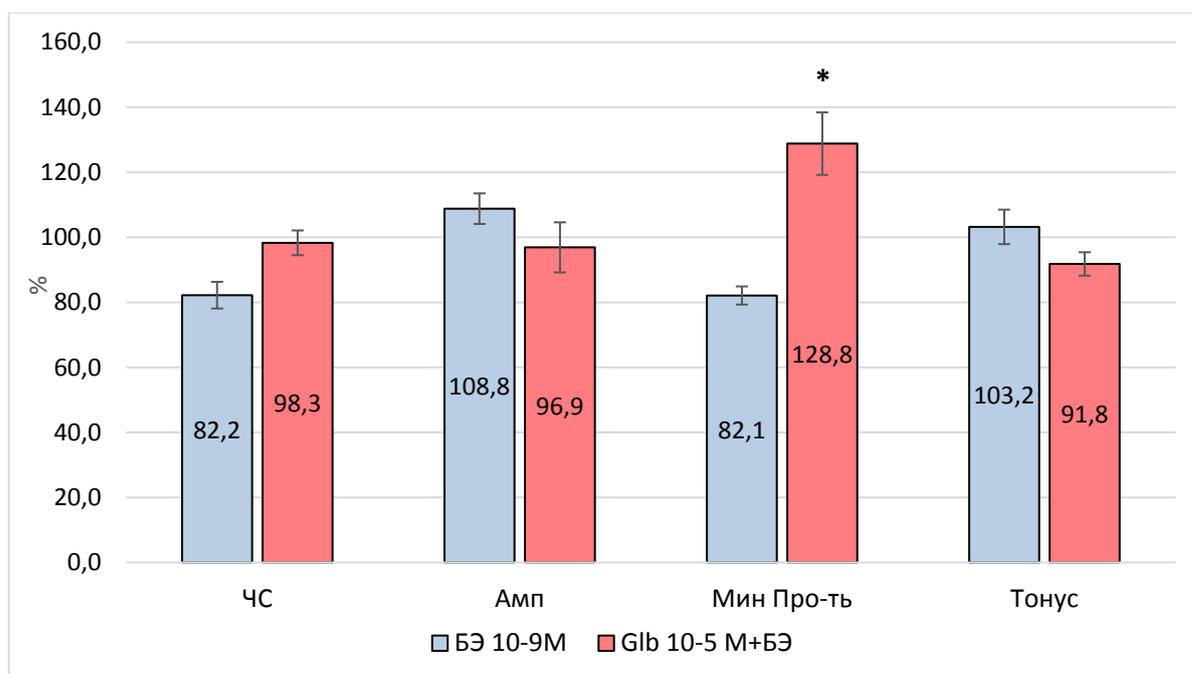


Рисунок 4.6 – Параметры сократительной активности изолированных ЛС при воздействии β -эндорфина на фоне Glb. Данные представлены в % по отношению к фону, * – статистически значимые различия по сравнению с изолированным применением β -эндорфина ($p \leq 0,05$)

Для оценки вклада эндотелий-зависимых механизмов в реализации общего эффекта β -эндорфина, оказываемого на ЛС, проведено исследование с использованием L-NAME – блокатора фермента NO синтазы, продуцируемого сосудистым эндотелием. Блокатор NO-синтазы использовался в концентрации 1×10^{-6} М и не оказывал значимого влияния на сократительную активность ЛС. Результаты исследования по оценке действия β -эндорфина на фоне блокатора NO-синтазы приведены в Таблице 4.7.

Таблица 4.7 – Параметры сократительной активности изолированных ЛС при воздействии β -эндорфина на фоне L-NAME. Данные представлены в относительных единицах по отношению к фону в виде $M \pm SD$, $n=11$

ОП, блокатор NO-синтазы	Частота сокращений	Амплитуда сокращений	Производительность	Тонус
β -эндорфин 1×10^{-9} М	$0,82 \pm 0,08^*$	$1,07 \pm 0,08$	$0,83 \pm 0,04^*$	$1,02 \pm 0,10$
L-NAME + β -эндорфин	$1,06 \pm 0,03^\#$	$1,07 \pm 0,03$	$1,09 \pm 0,05^\#$	$0,99 \pm 0,02$

Примечание – * – статистически значимые различия по сравнению с фоновыми значениями ($p \leq 0,05$); # – статистически значимые различия по сравнению с изолированным применением β -эндорфина ($p \leq 0,05$)

На фоне применения блокатора NO-синтазы тормозное влияние β -эндорфина на сократительную активность лимфангионов не проявлялось. Напротив, отмечалось увеличение частоты и амплитуды сокращений ЛС, что способствовало росту минутной производительности. Тоническое напряжение не изменялось. Полученные данные показывают, что в реализации эффекта β -эндорфина на брыжеечные ЛС крысы принимают участие эндотелий-(NO)-зависимые механизмы.

На Рисунке 4.7 представлены показатели сократительной активности ЛС при изолированном действии β -эндорфина, а также на фоне L-NAME.

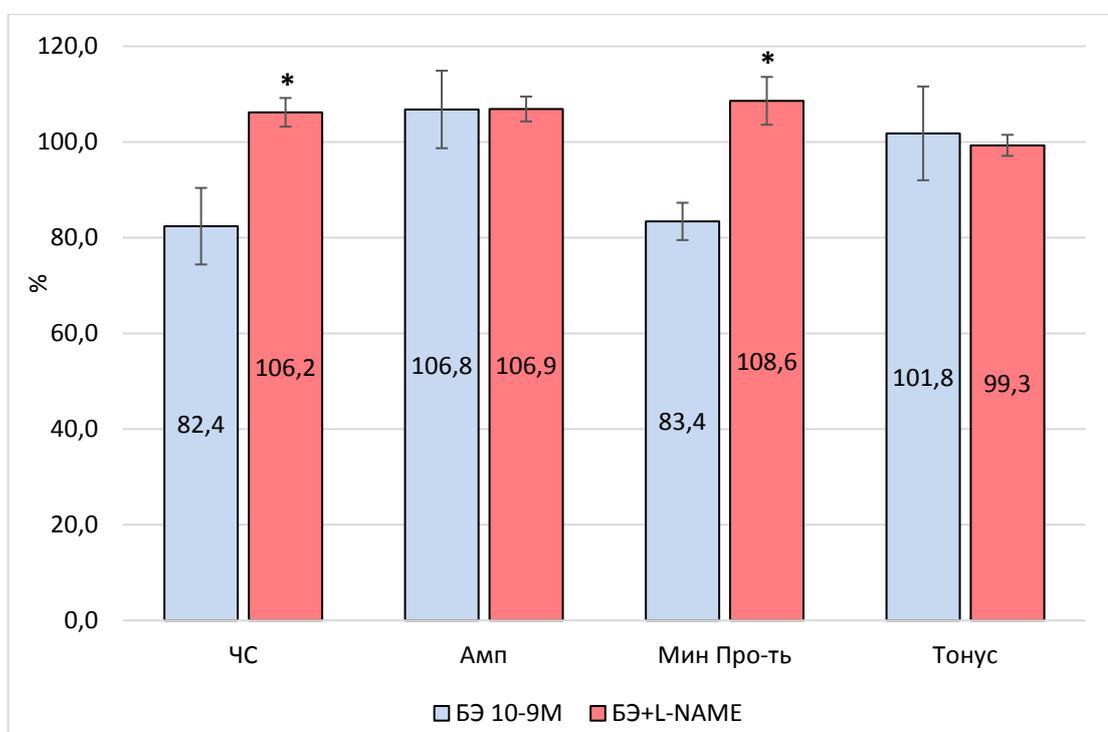


Рисунок 4.7 – Параметры сократительной активности изолированных ЛС при воздействии β -эндорфина на фоне L-NAME. Данные представлены в % по отношению к фону, * – статистически значимые различия по сравнению с изолированным применением β -эндорфина ($p \leq 0,05$)

4.1.2. Обсуждение результатов

Согласно имеющимся литературным данным, содержание β -эндорфина в тканях животных составляет в среднем 10^{-12} – 10^{-10} М [4, 260]. В результате проведенных экспериментов зарегистрировано изменение сократительной

активности изолированных брыжеечных ЛС крысы при действии β -эндорфина в концентрациях 10^{-11} – 10^{-8} М, что свидетельствует о высокой чувствительности исследуемых объектов к действию изучаемого ОП.

β -эндорфин оказывал ингибирующее влияние на сократительную активность лимфангионов. Данный эффект не выявлялся в присутствии блокатора μ -ОР СТОР и блокатора δ -ОР налтриндола. Это свидетельствует в пользу того, что периферические μ - и δ -ОР лимфангионов опосредуют снижение сократительной функции ЛС, вызванное применением β -эндорфина.

Известно, что сосудорасширяющие эффекты μ и δ -агонистов, выявленные в пиальных артериях связаны с активацией АТФ-чувствительных K^+ -каналов, которые исчезают после предварительного введения гlibенкламида [240], а стимуляция δ -ОР приводит к увеличению проницаемости K^+ -каналов и повышению активности NO-синтазы [256]. Влияние β -эндорфина на ЛС реализуется посредством активации как потенциал-зависимых, так и АТФ-чувствительных K^+ -каналов, так как блокада K^+ -каналов AP и Glib, уменьшала тормозное влияние β -эндорфина на моторику ЛС. Ингибирующее влияние β -эндорфина на фоне блокатора NO-синтазы полностью нивелируется, что доказывает его эндотелиальный NO-зависимый механизм действия. Полученные результаты являются подтверждением участия ОР в механизмах действия β -эндорфина на эндотелиоциты и ГМК лимфангионов.

Таким образом, в ходе экспериментальных исследований установлено:

- воздействие β -эндорфина приводит к уменьшению производительности ЛС крысы;
- эффект β -эндорфина в изолированных брыжеечных ЛС крысы является налоксон-зависимым и вероятной мишенью для β -эндорфина являются μ - и δ -ОР;
- эффект β -эндорфина реализуется посредством активации как потенциал-зависимых, так и АТФ-чувствительных K^+ -каналов, при этом вклад АТФ-чувствительных K^+ -каналов более выражен;

– реализация эффекта β -эндорфина на ЛС осуществляется при участии эндотелий- (NO)- зависимых механизмов.

4.2. Сократительная активность лимфатических сосудов при действии эндоморфина-1

В качестве представителя группы эндоморфинов для изучения влияния на сократительную активность изолированных ЛС был выбран эндоморфин-1 (ЭМ-1), который использовался в том же диапазоне концентраций – 10^{-12} – 10^{-8} М, что и β -эндорфин. Указанный диапазон концентраций включает в себя эндогенный уровень ОП, представленный в литературе [57, 159, 202]. Продолжительность воздействия ЭМ-1 в каждой концентрации составила 10 минут. В Таблице 4.8 приведены параметры сократительной активности сегментов брыжеечных ЛС крысы при использовании ЭМ-1.

Таблица 4.8 – Изменение параметров сократительной активности изолированных ЛС крысы при действии ЭМ-1. Данные представлены в относительных единицах по отношению к фону в виде $M \pm SD$, $n=12$

ЭМ-1, М	Частота сокращений	Амплитуда сокращений	Производительность	Тонус
1×10^{-12}	$0,96 \pm 0,06$	$1,00 \pm 0,02$	$1,01 \pm 0,03$	$0,99 \pm 0,03$
1×10^{-11}	$0,95 \pm 0,05$	$1,01 \pm 0,01$	$1,01 \pm 0,05$	$0,98 \pm 0,02$
1×10^{-10}	$1,09 \pm 0,08$	$1,04 \pm 0,04$	$1,15 \pm 0,07$	$0,98 \pm 0,02$
1×10^{-9}	$1,08 \pm 0,05$	$1,08 \pm 0,04$	$1,13 \pm 0,07^*$	$0,98 \pm 0,03$
1×10^{-8}	$1,04 \pm 0,02$	$1,04 \pm 0,04$	$1,17 \pm 0,10^*$	$0,96 \pm 0,03$

Примечание – * – статистически значимые различия по сравнению с фоновыми значениями ($p \leq 0,05$).

Как следует из полученных данных, применение ЭМ-1 в концентрациях 1×10^{-10} – 1×10^{-8} М оказывает слабо выраженное стимулирующее влияние на фазную активность лимфангионов: амплитуда и частота одиночных сокращений ЛС имели тенденцию к увеличению и не зависели от концентрации исследуемого вещества. При этом уровень тонического напряжения практически не изменялся. Минутная производительность при применении ОП в концентрациях 10^{-10} – 10^{-8}

М увеличивалась, причем увеличение не зависело от концентрации ЭМ-1. При действии ЭМ-1 в концентрациях 1×10^{-9} и 1×10^{-8} М увеличение минутной производительности было статистически значимым в сравнении с фоном.

Литературные данные, в которых были бы представлены результаты экспериментального исследования по оценке влияния ЭМ-1 на сократительную активность миокарда и сосудистых гладких мышц, немногочисленны. Согласно имеющимся источникам, ЭМ-1 является «классическим» агонистом μ -ОР [57], а действие селективных агонистов μ -ОР способствует снижению сократительной активности сердца и расширению периферических кровеносных сосудов [82, 99, 272]. Выявленные эффекты обусловлены скоординированными изменениями на клеточном уровне – закрытием потенциал-чувствительных Ca^{2+} -каналов, активацией K^{+} -каналов и уменьшением образования ц-АМФ. С учетом определенной общности механизмов, лежащих в основе сократительной активности гладких мышц ЛС и гладких мышц кровеносных сосудов с одной стороны и кардиомиоцитов с другой, представлялось обоснованным ожидание сходного эффекта при действии ЭМ-1 на лимфангионы. Тем более, что при изучении влияния на ЛС селективного агониста μ -ОР DAMGO также было зарегистрировано его угнетающее влияние на сократительную активность изолированных ЛС (см. главу 3). Однако в проведенных экспериментах с ЭМ-1, вопреки предположениям, действие ОП в исследуемом диапазоне концентраций не приводило к снижению параметров сократительной активности ЛС, более того, выявлено хотя и слабо выраженное, но стабильное, не зависящее от концентрации в диапазоне 10^{-10} – 10^{-8} М, стимулирующее влияние, приводящее к увеличению производительности в среднем на 15% в сравнении с фоном.

4.2.1. Изучение механизмов действия эндоморфина-1 на лимфатические сосуды крысы

Для установления вклада ОР в эффект ЭМ-1 на ЛС были проведены эксперименты с использованием селективного блокатора μ -ОР СТОР в

концентрации 1×10^{-7} М. В данной концентрации антагонист не влиял на сократительную активность ЛС. В качестве тестируемой концентрации ЭМ-1 была выбрана 1×10^{-9} М, при которой был выявлен статистически значимый рост производительности ЛС. Полученные результаты представлены в Таблице 4.9.

Таблица 4.9 – Параметры сократительной активности изолированных ЛС крысы при действии ЭМ-1 на фоне СТОР по отношению к фону. Данные представлены в относительных единицах в виде $M \pm SD$, $n=10$

ОП, блокатор ОР	Частота сокращений	Амплитуда сокращений	Производительность	Тонус
ЭМ-1, 1×10^{-9} М	$1,08 \pm 0,05$	$1,08 \pm 0,05$	$1,13 \pm 0,07^*$	$0,98 \pm 0,03$
СТОР+ ЭМ-1	$1,07 \pm 0,03$	$1,06 \pm 0,05$	$1,14 \pm 0,07^*$	$1,00 \pm 0,07$
Примечание – * – статистически значимые различия по сравнению с фоновыми значениями ($p \leq 0,05$).				

Как видно из данных, приведённых в Таблице 4.9, на фоне действия СТОР стимулирующее действие ЭМ-1 сохранялось – фиксировался рост ЧС, амплитуды и минутной производительности. Таким образом, можно сделать вывод, что полученный эффект ЭМ-1 реализуется без участия μ -ОР.

Согласно литературным данным μ -агонисты, вызывают снижение функциональной активности органов (клеток). Так как наблюдаемый угнетающий сократительную активность ЛС эффект при действии ЭМ-1 не блокировался антагонистом μ -ОР, были проведены эксперименты с применением неселективного блокатора ОР налоксона, с целью определения осуществляется ли зарегистрированный эффект ЭМ-1 через ОР, поскольку, согласно современным литературным данным, ОП способны активировать передачу сигналов G-белка посредством взаимодействия со всеми типами ОР, но с разной активностью [75]. Налоксон использовался в концентрации 3×10^{-6} М. Изолированное применение налоксона не оказывало влияния на сократительную активность ЛС. ЭМ-1 использовался в той же концентрации – 1×10^{-9} М. Полученные данные представлены в Таблице 4.10.

Как видно из полученных данных, слабо выраженное стимулирующее действие ЭМ-1 на моторику ЛС на фоне блокатора ОР налоксона в целом

сохранялось: отмечена тенденция к росту частоты и амплитуды сокращений, при увеличении минутной производительности на 11% ($p \leq 0,05$).

Таблица 4.10 – Параметры сократительной активности изолированных ЛС крысы при действии ЭМ-1 на фоне налоксона по отношению к фону. Данные представлены в относительных единицах в виде $M \pm SD$, $n=10$

ОП, блокатор ОР	Частота сокращений	Амплитуда сокращений	Производительность	Тонус
ЭМ-1, 1×10^{-9} М	$1,08 \pm 0,10$	$1,08 \pm 0,05$	$1,13 \pm 0,07^*$	$0,98 \pm 0,03$
Налоксон+ ЭМ-1	$1,03 \pm 0,01$	$1,07 \pm 0,02$	$1,11 \pm 0,03^*$	$0,98 \pm 0,05$

Примечание – * – статистически значимые различия по сравнению с фоновыми значениями ($p \leq 0,05$).

На Рисунке 4.8 представлены наиболее информативные показатели сократительной активности ЛС при изолированном действии ЭМ-1, а также на фоне блокаторов μ -ОР СТОР и неселективного блокатора ОР налоксона.

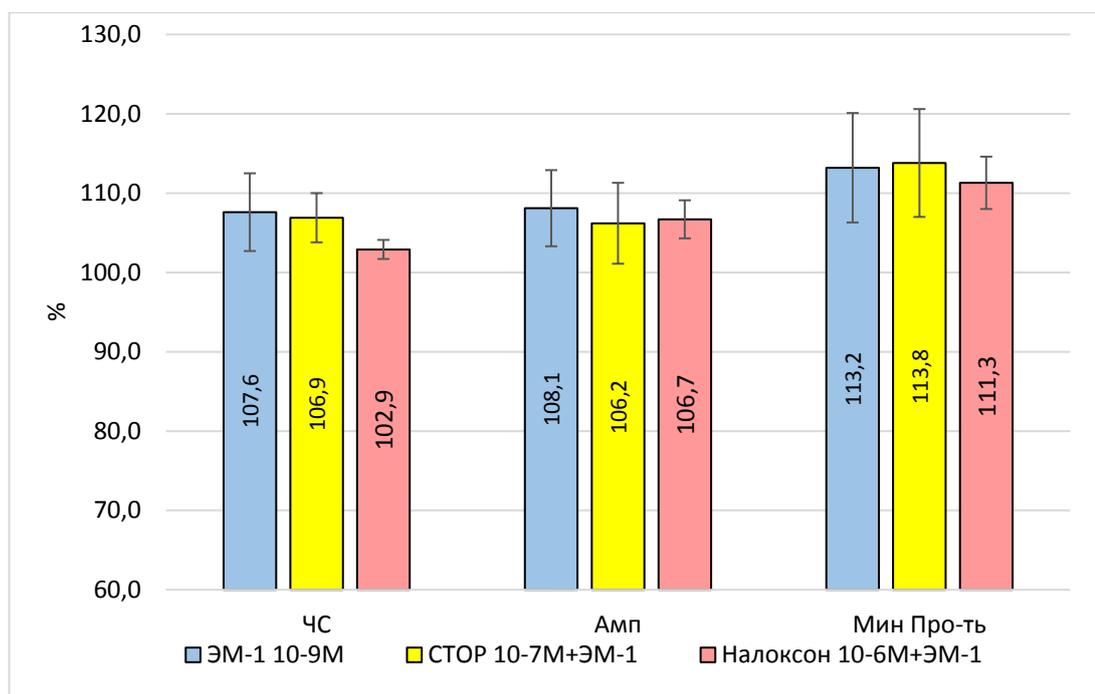


Рисунок 4.8 – Параметры сократительной активности изолированных ЛС при воздействии эндоморфина-1 на фоне налоксона и СТОР. Данные представлены в % по отношению к фону

Таким образом, стимулирующее действие ЭМ-1 на моторику ЛС на фоне как селективного, так и неселективного антагонистов ОР сохранялось, и это дает

основание предположить, что изменение сократительной активности ЛС под действием ЭМ-1 реализуется при участии налоксон-независимого механизма и не связано с его взаимодействием с ОР.

Несмотря на то, что эндоморфины позиционируются как эндогенные селективные лиганды μ -ОР, они фактически имеют самую низкую эффективность, оцененную путем измерения способности эндогенных лигандов активировать G-белок через μ -ОР. В отличие от других эндогенных опиоидных пептидов (мет-энкефалина, лей-энкефалина, β -эндорфина) эндоморфин-1 и -2 являются самыми слабыми агонистами в этой системе [250]. П. Коссон с коллегами при теоретическом анализе обнаружили сходство структур эндоморфинов и тахикининовых пептидомиметиков и установили достоверную, хотя и слабую, аффинность ЭМ-1 к NK1-рецепторам ($K_i=70 \mu\text{M}$) [120]. Этот «компонент тахикинина» может играть значительную модуляторную роль основной функции опиоидного агониста ЭМ-1. Известно, что NK1-рецепторы экспрессируются в гладкомышечных клетках ЛС и являются компонентами сигнального пути агониста NK-рецепторов SP [252]. Эффект реализуется посредством увеличения уровня внутриклеточного кальция вследствие активации Ca^{2+} -каналов внутриклеточных депо. При оценке влияния эндоморфинов на уровень внутриклеточного кальция было установлено, что эндоморфины, используемые в концентрации 1 мМ, увеличивают его уровень в фура-2-загруженных суспензиях СНО (Chinese hamster ovary) клеток, трансфецированных μ -ОР при налоксон-обратимом способе [261]. Полученный эффект был чувствительным к тапсигаргину, это указывает на то, что высвобождение Ca^{2+} происходило из внутриклеточных хранилищ [148]. Поскольку показано, что в стимулирующем эффекте ЭМ-1 также задействованы внутриклеточные депо Ca^{2+} , в ГМК ЛС экспрессируются NK1-рецепторы, а ЭМ-1 имеет достоверную аффинность к данному типу рецепторов и эффект на ЛС при активации NK1-рецепторов SP схож с эффектом ЭМ-1, представлялось целесообразным проведение экспериментов по оценке влияния ЭМ-1 на ЛС с использованием селективного антагониста NK-1 рецепторов CP-96345.

Из литературных данных известно, что CP-96345 в концентрациях 1×10^{-5} М и выше вызывает угнетение спонтанных сокращений воротной вены крысы в экспериментах *in vitro* [96]. В связи с этим, CP-96345, как селективный антагонист NK-1 рецепторов в экспериментах с изолированными ЛС, использовался в концентрации 1×10^{-6} М, не вызывающей статистически значимых изменений сократительной активности ЛС. ЭМ-1 использовался в концентрации 1×10^{-9} М. Результаты, полученные при применении ЭМ-1 на фоне CP-96345, представлены в Таблице 4.11.

Таблица 4.11 – Параметры сократительной активности изолированных ЛС крысы при действии ЭМ-1 на фоне CP-96345. Данные представлены в относительных единицах в виде $M \pm SD$ по отношению к фону, $n=11$

ОП, блокатор NK-1 рецепторов	Частота сокращений	Амплитуда сокращений	Производительность	Тонус
ЭМ-1, 1×10^{-9} М	$1,07 \pm 0,05$	$1,07 \pm 0,04$	$1,12 \pm 0,05^*$	$0,99 \pm 0,02$
CP-96345+ЭМ-1	$1,02 \pm 0,05$	$0,98 \pm 0,04$	$1,01 \pm 0,06$	$0,99 \pm 0,06$
Примечание – * – статистически значимые различия по сравнению с фоновыми значениями ($p \leq 0,05$).				

Согласно данным, приведенным в Таблице 4.11, стимулирующий эффект ЭМ-1 на ЛС не проявлялся в присутствии CP-96345. На Рисунке 4.9 графически приведены параметры сократительной активности ЛС при изолированном действии ЭМ-1, а также на фоне блокатора NK-1 рецепторов CP-96345. Таким образом, экспериментально подтверждено предположение о реализации эффекта ЭМ-1 на ЛС посредством стимуляции NK-1 рецепторов.

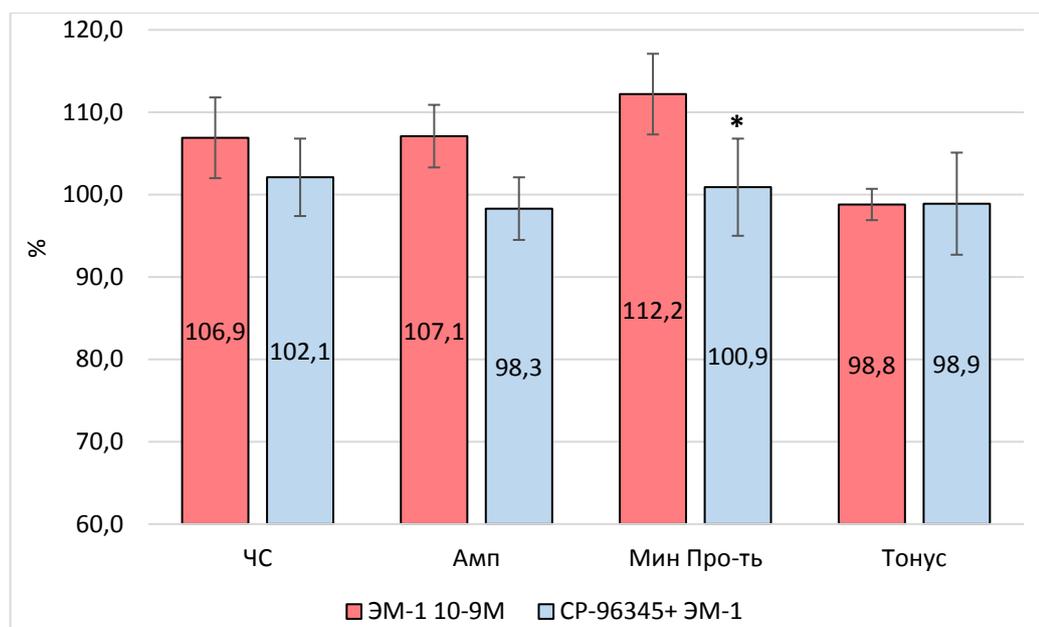


Рисунок 4.9 – Параметры сократительной активности изолированных ЛС при воздействии ЭМ-1 на фоне блокатора NK-1 рецепторов CP-96345. Данные представлены в % по отношению к фону. * – статистически значимые различия по сравнению с изолированным применением ЭМ-1 ($p \leq 0,05$)

Поскольку эффект ЭМ-1 характеризуется увеличением параметров фазной активности и минутной производительности ЛС, а эффект сигнального пути агонистов NK-рецепторов реализуется посредством увеличения уровня внутриклеточного кальция [252], для установления роли ионов Ca^{2+} в вазоактивном действии ОП проведены эксперименты с использованием рутениума красного (РК) – ингибитора Ca^{2+} каналов СПР (рианодиновых рецепторов) [45] в концентрации 1×10^{-6} М. В этой концентрации РК не оказывал влияния на сократительную активность ЛС. ЭМ-1 использовался в концентрации 1×10^{-9} М. Полученные данные представлены в Таблице 4.12.

На фоне применения РК стимулирующее влияние ЭМ-1 на сократительную активность лимфангионов проявлялось в меньшей степени, чем при его изолированном использовании: рост ЧС и минутной производительности составил 5% и 7%, соответственно. Амплитуда сокращений и тонического напряжения регистрировались на уровне фоновых показателей. Таким образом, реализация стимулирующего эффекта ЭМ-1, по крайней мере частично,

обусловлена рекрутированием Ca^{2+} из внутриклеточных хранилищ, посредством активации рианодиновых рецепторов.

Таблица 4.12 – Показатели сократительной активности изолированных ЛС крысы при действии ЭМ-1 на фоне РК. Данные представлены в относительных единицах в виде $M \pm SD$ по отношению к фону, $n=8$

ОП, блокатор рианодиновых рц	Частота сокращений	Амплитуда сокращений	Производительность	Тонус
ЭМ-1, 10^{-9} М	$1,09 \pm 0,06$	$1,07 \pm 0,04$	$1,14 \pm 0,07^*$	$0,97 \pm 0,03$
РК 10^{-6} М +ЭМ-1	$1,05 \pm 0,03$	$1,00 \pm 0,02$	$1,07 \pm 0,04$	$1,00 \pm 0,01$
Примечание – * – статистически значимые различия по сравнению с фоновыми значениями ($p \leq 0,05$)				

Мобилизация внутриклеточного кальция также возможна через IP_3 -путь, при котором вторичный мессенджер IP_3 связывается со своим специфическим рецептором на мембране СПР, являющимся Ca -каналом. Для проверки данной версии были проведены эксперименты с блокатором IP_3 -активируемых кальциевых каналов СПР – гепарином. Блокатор использовался в концентрации 5 ЕД/мл, поскольку применение гепарина в этой концентрации не вызывало статистически значимых изменений частоты и амплитуды фазных сокращений лимфангионов [13]. Обладая целевой эффективностью, в данном исследовании гепарин в заявленной концентрации не вызвал статистически значимых изменений показателей сократительной активности лимфангионов. ЭМ-1 использовался в концентрации 1×10^{-9} М. Полученные данные представлены в Таблице 4.13.

Таблица 4.13 – Показатели сократительной активности изолированных ЛС крысы при действии ЭМ-1 на фоне гепарина по отношению к фону. Данные представлены в относительных единицах в виде $M \pm SD$, $n=10$

ОП, блокатор Ca^{2+} каналов СПР	Частота сокращений	Амплитуда сокращений	Производительность	Тонус
ЭМ-1, 1×10^{-9} М	$1,09 \pm 0,06$	$1,07 \pm 0,04$	$1,14 \pm 0,07^*$	$0,97 \pm 0,03$
гепарин 5 ЕД/ мл + ЭМ-1	$1,04 \pm 0,03$	$1,02 \pm 0,04$	$1,08 \pm 0,02$	$1,01 \pm 0,01$
Примечание – * – статистически значимые различия по сравнению с фоновыми значениями ($p \leq 0,05$)				

Как следует из приведенных данных, на фоне применения гепарина стимулирующее влияние ЭМ-1 на сократительную активность лимфангионов проявлялось в меньшей степени, чем при его изолированном применении: рост ЧС составил 4% от фоновых значений, минутной производительности – 8%. Полученные данные показывают, что реализация стимулирующего эффекта ЭМ-1 осуществляется с участием ионов Ca^{2+} , высвобождаемых из внутриклеточных хранилищ, посредством активации IP_3 -активируемых рецепторов.

На Рисунке 4.10 представлены параметры сократительной активности ЛС изолированного действия ЭМ-1, а также на фоне блокаторов внутриклеточных кальциевых депо.

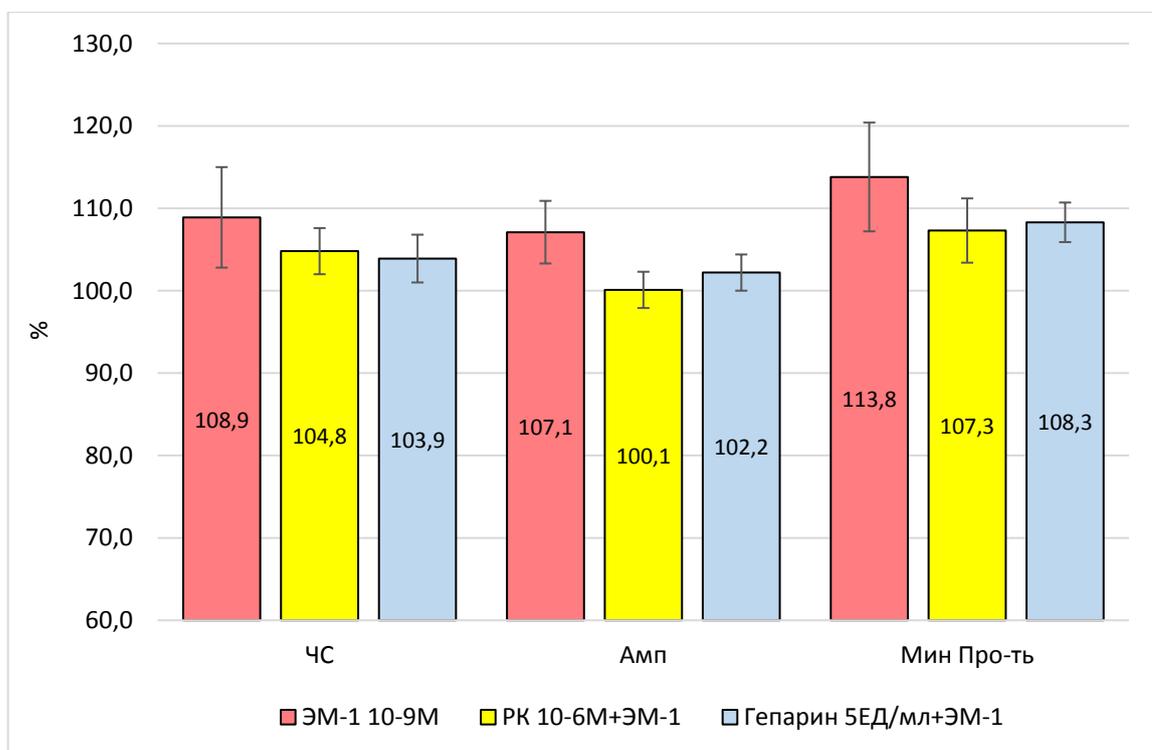


Рисунок 4.10 – Параметры сократительной активности изолированных ЛС при воздействии ЭМ-1 на фоне РК и гепарина. Данные представлены в % по отношению к фону

4.2.2. Обсуждение результатов

Согласно имеющимся литературным данным, содержание ЭМ-1 в тканях животных составляет в среднем 10^{-10} – 10^{-9} М [57, 159, 202]. В наших

экспериментах зарегистрировано изменение сократительной активности изолированных брыжеечных ЛС при действии ЭМ-1 в данных концентрациях, что свидетельствует о высокой чувствительности исследуемых объектов к действию изучаемого ОП. Однако, полученные результаты разнятся с литературными данными о влиянии эндоморфинов на объекты ССС, где ЭМ-1, как селективный агонист μ -ОР оказывал вазодилаторное действие [78, 148]. В наших же экспериментах выявлено стимулирующее влияние ЭМ-1 на сократительную активность брыжеечных ЛС крысы. Поскольку, в присутствии селективного блокатора μ -ОР СТОР, а также неселективного блокатора ОР налоксона, стимулирующее влияние ЭМ-1 на лимфангионы сохранялось, вероятней всего, стимулирующий эффект ЭМ-1 на ЛС реализовывался при участии налоксон-независимого механизма и не связан с его взаимодействием с ОР (неопиоидное действие).

Сходство структур эндоморфинов и тахикининовых пептидомиметиков, установленная достоверная аффинность ЭМ-1 к NK1-рецепторам, а также экспрессия NK1-рецепторов в гладкомышечных клетках ЛС, позволили использовать блокатор NK-1 рецепторов – CP-96345 для изучения механизма стимулирующего влияния ЭМ-1 на брыжеечные ЛС. В результате экспериментов было обнаружено, что на фоне блокатора NK-1 рецепторов стимулирующее влияние ОП не проявлялось. Это подтвердило наше предположение о том, что стимулирующее влияние ЭМ-1 на брыжеечные ЛС опосредовано NK-1 рецепторами.

Для установления роли ионов Ca^{2+} в вазоактивном действии ОП были использованы блокатор рианодинных рецепторов внутриклеточных депо РК и блокатор IP_3 рецепторов гепарин. Оба эти рецептора являются Ca-каналами СПР. Полученные в экспериментах данные свидетельствуют о том, что реализация стимулирующего эффекта ЭМ-1 на брыжеечные ЛС крысы осуществляется за счет рекрутирования ионов Ca^{2+} из внутриклеточных хранилищ, как через рианодинные рецепторы, так и IP_3 рецепторы. В пользу этого свидетельствует преимущественное снижение амплитуды фазных сокращений, приводящее, в

конечном счете, к снижению минутной производительности ЛС на фоне блокаторов.

Таким образом, в ходе экспериментальных исследований установлено:

- ЭМ-1 способствует увеличению сократительной активности брыжеечных ЛС крысы;
- стимулирующий эффект ЭМ-1 на ЛС реализуется при участии налоксон-независимого механизма и не связан с его взаимодействием с ОР;
- в брыжеечных ЛС крысы вероятной мишенью для ЭМ-1 являются НК-1 рецепторы;
- реализация стимулирующего эффекта ЭМ-1 на ЛС осуществляется за счет рекрутирования Ca^{2+} внутриклеточных депо при участии рианодиновых и IP_3 рецепторов.

4.3. Сократительная активность лимфатических сосудов при действии динорфина А

Результаты проведенных нами исследований с применением селективного агониста к-ОР U-69593, представленные в главе 3, послужили основанием для оценки роли динорфинов (эндогенных агонистов к-ОР) на сократительную активность ЛС. В качестве исследуемого ОП группы динорфинов был выбран динорфин А (1-17), поскольку он обладает кардио- и вазоактивностью [90, 105, 106, 214]. Был использован тот же диапазон исследуемых концентраций, что и при изучении β -эндорфина и ЭМ-1 – 1×10^{-12} – 1×10^{-8} М. По имеющимся литературным данным, указанный диапазон концентраций соответствовал эндогенному уровню ОП [59, 90, 246] Продолжительность воздействия динорфина А в каждой концентрации составляла 10 минут.

Согласно полученным результатам, применение динорфина А в концентрациях 10^{-11} – 10^{-8} М приводило к стимуляции сократительной активности брыжеечных ЛС: наблюдалось увеличение частоты фазных сокращений и минутной производительности. Амплитуда сокращений незначительно

увеличивалась. Максимальный эффект был зафиксирован при воздействии динорфина А в концентрации 10^{-10} М. При этом частота сокращений увеличилась на 18% ($p \leq 0,05$), амплитуда сокращений – на 6%, минутная производительность – на 42% ($p \leq 0,01$). Полученные результаты воздействия ОП на брыжеечные ЛС крысы представлены в Таблице 4.14.

Таблица 4.14 – Изменение параметров сократительной активности изолированных ЛС при действии динорфина А. Данные представлены в относительных единицах по отношению к фону в виде $M \pm SD$; $n=9$

Динорфин А, М	Частота сокращений	Амплитуда сокращений	Производительность	Тонус
1×10^{-12}	$1,02 \pm 0,02$	$1,01 \pm 0,03$	$1,03 \pm 0,06$	$0,99 \pm 0,04$
1×10^{-11}	$1,05 \pm 0,03$	$1,04 \pm 0,04$	$1,19 \pm 0,06^*$	$1,02 \pm 0,02$
1×10^{-10}	$1,18 \pm 0,07^*$	$1,06 \pm 0,02$	$1,42 \pm 0,09^{**}$	$1,06 \pm 0,06$
1×10^{-9}	$1,07 \pm 0,07$	$1,04 \pm 0,02$	$1,22 \pm 0,05^*$	$1,03 \pm 0,06$
1×10^{-8}	$1,03 \pm 0,05$	$1,02 \pm 0,02$	$1,08 \pm 0,04$	$0,99 \pm 0,11$
Примечание – *, ** – статистически значимые различия по сравнению с фоновыми значениями ($p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$)				

4.3.1. Изучение механизмов действия динорфина А на лимфатические сосуды крысы

Полученный стимулирующий эффект динорфина А на ЛС сопоставим с эффектом, зарегистрированным в наших исследованиях (см. главу 3) при применении селективного агониста к-ОР U-69593. Полученные результаты соответствуют данным, полученных Спампинато С., согласно которым, динорфин определен в предсердиях и желудочках сердца [246] и, через активацию к-ОР, вызывает увеличение сократительной способности кардиомиоцитов [90].

Для выяснения механизмов действия динорфина А на брыжеечные ЛС крысы проведены эксперименты, первая серия которых имела целью установление, является ли полученный эффект ОП налоксон-зависимым. Для этого был использован неселективный блокатор ОР налоксон. Антагонист ОР использовался в концентрации 1×10^{-6} М, в которой не оказывал статистически значимого влияния на сократительную активность ЛС. Динорфин А использовался в концентрации 1×10^{-10} М, действие которой приводило к

максимальному статистически значимому увеличению параметров сократительной активности ЛС. Полученные результаты представлены в Таблице 4.15.

Таблица 4.15 – Параметры сократительной активности изолированных ЛС крысы при действии динорфина А на фоне неселективного блокатора ОР налоксона. Данные представлены в относительных единицах по отношению к фону в виде $M \pm SD$, $n=8$

ОП, блокатор ОР	Частота сокращений	Амплитуда сокращений	Производительность	Тонус
Динорфин А, 1×10^{-10} М	$1,19 \pm 0,06^*$	$1,06 \pm 0,03$	$1,40 \pm 0,08^{**}$	$1,05 \pm 0,06$
Налоксон 10^{-6} М + Динорфин А	$1,04 \pm 0,05\#$	$1,02 \pm 0,04$	$1,05 \pm 0,03\#$	$1,01 \pm 0,01$
Примечание – *, ** – статистически значимые различия по сравнению с фоновыми значениями ($p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$); # – статистически значимые различия по сравнению с изолированным применением динорфина А ($p \leq 0,05$)				

Как следует из приведенных данных, на фоне налоксона стимулирующий эффект динорфина А на моторику ЛС не проявлялся: параметры сократительной активности практически не отличались от фоновых значений. Таким образом, стимулирующее действие динорфина А на ЛС опосредуется ОР.

Поскольку динорфин А позиционируется в первую очередь как агонист κ -ОР, были проведены эксперименты с селективным антагонистом κ -ОР nBNI, использованным в концентрации 1×10^{-6} М. В результате экспериментов обнаружено, что антагонист обладает стимулирующим влиянием на сократительную активность ЛС, проявляющуюся увеличением частоты сокращений и минутной производительности. В тоже время, на фоне nBNI стимулирующее действие динорфина А не проявлялось. Полученные результаты представлены в Таблице 4.16.

На Рисунке 4.11 представлены параметры сократительной активности ЛС, при изолированном действии динорфина А и на фоне блокаторов ОР. Поскольку стимулирующее влияние динорфина А на фоне как налоксона, так и nBNI не проявлялось, можно сделать вывод, что действие ОП реализуется посредством ОР, в частности через κ -ОР.

Таблица 4.16 – Показатели сократительной активности изолированных ЛС крысы при действии динорфина А на фоне блокатора к-ОР. Данные представлены в относительных единицах по отношению к фону в виде $M \pm SD$, $n=10$

ОП, блокатор ОР	Частота сокращений	Амплитуда сокращений	Производительность	Тонус
Динорфин А, 1×10^{-10} М	$1,19 \pm 0,06^*$	$1,06 \pm 0,03$	$1,40 \pm 0,08^{**}$	$1,05 \pm 0,06$
nBNI, 1×10^{-6} М	$1,13 \pm 0,03^{**}$	$0,96 \pm 0,03$	$1,11 \pm 0,08^*$	$1,01 \pm 0,01$
nBNI + динорфин А	$1,05 \pm 0,03^{\#}$	$0,98 \pm 0,02$	$1,05 \pm 0,03^{\#}$	$1,01 \pm 0,01$

Примечание – *, ** – статистически значимые различия по сравнению с фоновыми значениями ($p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$); # – статистически значимые различия по сравнению с изолированным применением динорфина А ($p \leq 0,05$)

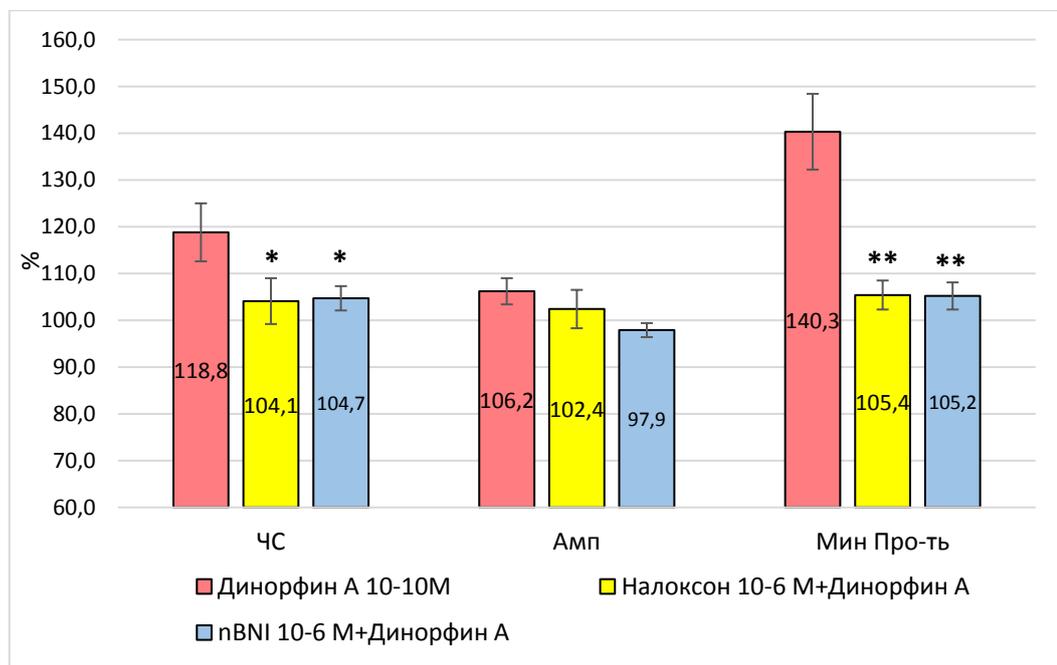


Рисунок 4.11 – Параметры сократительной активности изолированных ЛС при воздействии динорфина А на фоне налоксона и nBNI. Данные представлены в % по отношению к фону; *, ** – статистически значимые различия по сравнению с изолированным применением динорфина А ($p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$)

Таким образом, эффект динорфина А на брыжеечные ЛС, который характеризуется увеличением параметров фазной активности и минутной производительности, является налоксон-зависимым и реализуется через активацию к-ОР. Сведения об экспрессии к-ОР в ЛС отсутствуют, однако к-ОР найдены на сарколемме и СПР кардиомиоцитов [52, 203], ко-локализованы с рецепторами рианоина СПР [269], а активация к-ОР в миоцитах желудочков

крысы вызывает мобилизацию внутриклеточного кальция через IP_3 -путь [169]. В связи с общностью регуляторных механизмов ЛС и миокарда, данные механизмы могут быть реализованы в брыжеечных ЛС крысы. В связи с этим, следующая серия экспериментов направлена на установление роли ионов Ca^{2+} в вазоактивном действии ОП. Для этого были проведены эксперименты с ингибитором Ca^{2+} -каналов СПР – РК в концентрации $1 \times 10^{-6} M$, в которой блокатор не вызывал изменений сократительной активности ЛС. Используемая концентрация динорфина А – $1 \times 10^{-10} M$. Полученные в исследовании данные представлены в Таблице 4.17.

Таблица 4.17 – Показатели сократительной активности изолированных ЛС крысы при действии динорфина А на фоне Рутениума Красного по отношению к фону. Данные представлены в относительных единицах в виде $M \pm SD$, $n=8$

ОП, блокатор рианодиновых рц	Частота сокращений	Амплитуда сокращений	Производительность	Тонус
Динорфин А, $1 \times 10^{-10} M$	$1,20 \pm 0,05^*$	$1,07 \pm 0,03$	$1,41 \pm 0,08^{**}$	$1,06 \pm 0,06$
РК $10^{-6} M$ + динорфин А	$1,13 \pm 0,05^*$	$1,02 \pm 0,04$	$1,24 \pm 0,12^{*\#}$	$0,98 \pm 0,01$
Примечание – * – статистически значимые различия по сравнению с фоновыми значениями ($p \leq 0,05$); # – статистически значимые различия по сравнению с изолированным применением динорфина А ($p \leq 0,05$)				

Как следует из приведенных в Таблице 4.17 данных, на фоне применения РК стимулирующее влияние динорфина А на сократительную активность лимфангионов проявлялось в меньшей степени, чем при его изолированном применении, однако полностью не нивелировалось. Так, ЧС составила 13% от фона ($p \leq 0,05$), а минутная производительность – 24% ($p \leq 0,05$). Амплитуда сокращений и тоническое напряжение оставались на уровне фоновых значений. Полученные данные показывают, что реализация стимулирующего эффекта динорфина А частично может осуществляться за счет участия ионов Ca^{2+} , высвобождаемых из внутриклеточных депо, посредством активации рианодиновых рецепторов.

Для проверки участия IP_3 -активируемых кальциевых каналов СПР в стимулирующем влиянии динорфина А на ЛС, были проведены эксперименты с

гепарином – блокатором IP_3 -активируемых кальциевых каналов СПР. Блокатор использовался в концентрации 5 ЕД/мл и не вызвал статистически значимых изменений показателей сократительной активности лимфангионов. Используемая концентрация динорфина А – 1×10^{-10} М.

Таблица 4.18 – Показатели сократительной активности ЛС крысы при действии динорфина А на фоне гепарина по отношению к фону. Данные представлены в относительных единицах в виде $M \pm SD$, $n=8$

ОП, блокатор Ca^{2+} каналов СПР	Частота сокращений	Амплитуда сокращений	Производительность	Тонус
Динорфин А, 1×10^{-10} М	$1,20 \pm 0,05^*$	$1,07 \pm 0,03$	$1,41 \pm 0,08^{**}$	$1,06 \pm 0,06$
Гепарин 5 ЕД/мл + динорфин А	$1,03 \pm 0,02\#$	$1,01 \pm 0,04$	$1,10 \pm 0,04^{*\#}$	$1,03 \pm 0,01$
Примечание – * – статистически значимые различия по сравнению с фоновыми значениями ($p \leq 0,05$)				

Как видно из данных, приведенных в Таблице 4.18, на фоне применения гепарина стимулирующее влияние динорфина А на сократительную активность лимфангионов проявлялось в меньшей степени, чем при его изолированном использовании. Причем увеличение ЧС было статистически незначимым, а единственным параметром сократительной активности, который достоверно изменялся, была минутная производительность. Её рост составил 10% от фоновых показателей ($p \leq 0,05$). Полученные данные показывают, что реализация стимулирующего эффекта динорфина А осуществляется с участием ионов Ca^{2+} , высвобождаемых из внутриклеточных хранилищ посредством активации IP_3 -рецепторов.

На Рисунке 4.12 представлены изменения параметров сократительной активности ЛС при изолированном влиянии динорфина А, а также на фоне применения блокаторов кальциевых каналов внутриклеточных депо.

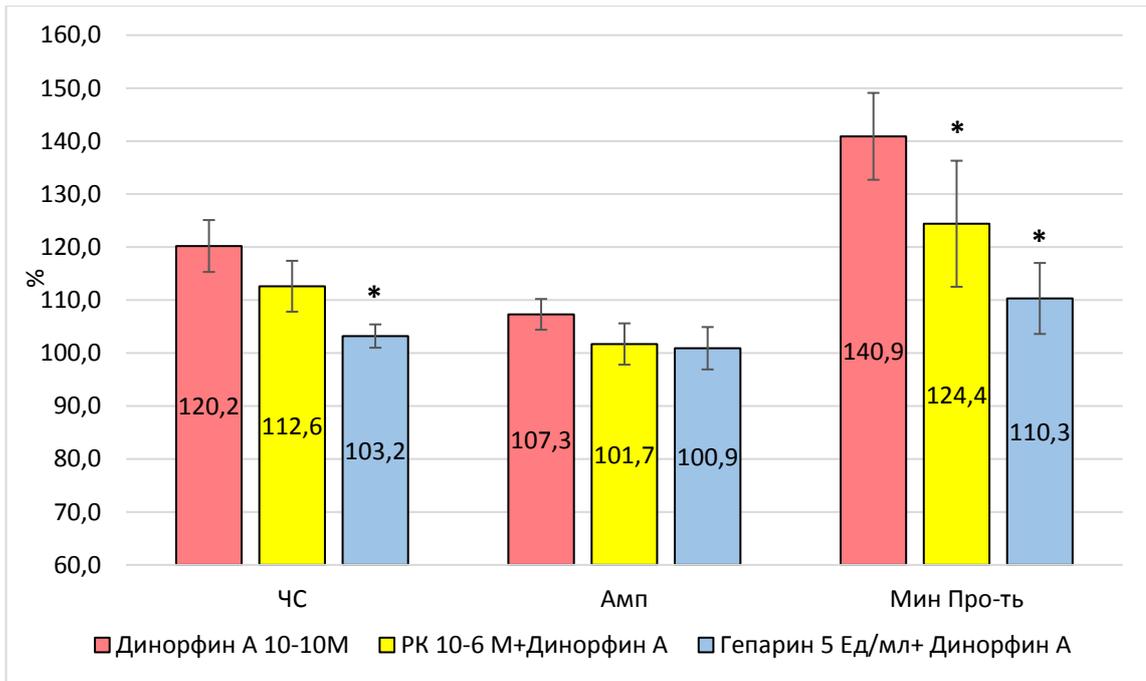


Рисунок 4.12 – Параметры сократительной активности изолированных ЛС при воздействии динорфина А на фоне РК и гепарина. Данные представлены в % по отношению к фону; * – статистически значимые различия по сравнению с изолированным применением динорфина А ($p \leq 0,05$)

Таким образом, стимулирующий эффект сократительной активности динорфина А на ЛС опосредован активацией Ca^{2+} -каналов внутриклеточных хранилищ. При этом вклад IP_3 -рецепторов в реализацию стимулирующего эффекта динорфина А на брыжеечные ЛС крысы, вероятно, наиболее существенен.

4.3.2. Обсуждение результатов

Согласно литературным данным, содержание динорфина А в тканях животных составляет в среднем 10^{-12} – 10^{-9} М [90]. В физиологических условиях динорфин А присутствует в крови в диапазоне 0,1–1,5 нМ [59, 246]. Изменение сократительной активности изолированных брыжеечных ЛС, зарегистрированное в наших экспериментах, при действии динорфина А свидетельствует о высокой чувствительности исследуемых объектов к действию изучаемого ОП.

Динорфин А в диапазоне концентраций 10^{-11} – 10^{-8} М оказывал стимулирующее влияние на моторику лимфангионов изолированных брыжеечных ЛС крысы. Зарегистрированный эффект согласуется с эффектом селективного к-агониста U-69593, описанным в главе 3. При этом характер изменений сократительной активности ЛС при действии динорфина А («куполообразное» изменение регистрируемых и расчетного показателя в диапазоне изучаемых концентраций 10^{-12} – 10^{-8} М с максимальным увеличением в концентрации 10^{-10} М) идентично изменениям сократительной активности к-агониста (Таблица 3.3, Рисунок 3.3, Таблица 4.14). Также было обнаружено, что параметры одиночных сокращений ЛС (амплитуда и частота сокращений) в условиях применения динорфина А во всех изучаемых концентрациях менялись менее значительно, чем интегральный показатель лимфангионов, который характеризовался более выраженным достоверным увеличением. Это связано с изменением формы сокращений, которые до воздействия ОП представляли собой чередование одиночных сокращений с сгруппированными, а после воздействия динорфина А регистрировались только сгруппированные сокращения (Рисунок 4.13), в результате чего «площадь по кривой» или минутная производительность ЛС возрастала.

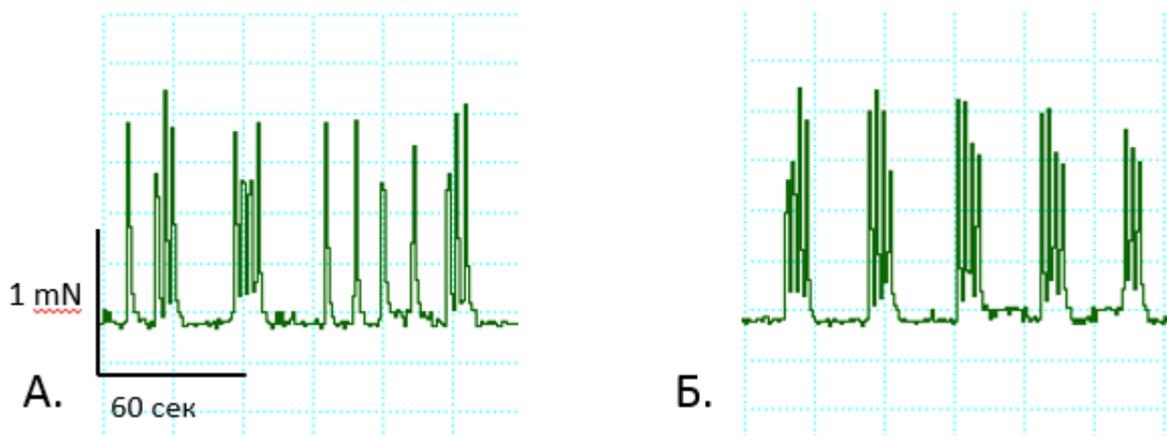


Рисунок 4.13 – Изменение сократительной активности ЛС при действии динорфина А. А – кривая записи сократительной активности интактных ЛС (фон). Б – кривая записи сократительной активности ЛС при воздействии динорфина А.

Разработан автором. Пояснения в тексте

Такое изменение сократительной активности ЛС приводит к увеличению пропульсивной активности лимфангионов и, вероятно, лежит в основе его антиаритмического действия.

В присутствии неселективного блокатора ОР налоксона, а также селективного блокатора к-ОР nBNI зарегистрированный стимулирующий эффект динорфина А на ЛС не проявлялся. Это свидетельствует в пользу того, эффект динорфина А в брыжеечных ЛС опосредуется периферическими к-ОР.

Для установления роли ионов Ca^{2+} в вазоактивном действии ОП были использованы блокатор IP_3 рецепторов – гепарин и блокатор рианодинных рецепторов внутриклеточных депо – РК. Поскольку, на фоне блокаторов эффект динорфина А на брыжеечные ЛС крысы нивелировался, можно заключить, что стимуляция моторики осуществляется за счет рекрутирования ионов Ca^{2+} из внутриклеточных хранилищ, как через рианодинные рецепторы, так и IP_3 рецепторы. В пользу этого свидетельствует зарегистрированное на фоне блокаторов снижение параметров фазных сокращений, приводящее, в конечном счете, к снижению минутной производительности ЛС.

Таким образом, в ходе экспериментальных исследований установлено:

- динорфин А стимулирует сократительную активность брыжеечных ЛС крысы, что приводит к увеличению производительности лимфангионов;
- эффект динорфина А в изолированных брыжеечных ЛС крысы является налоксон-зависимым;
- в брыжеечных ЛС крысы вероятной мишенью для динорфина А являются к-ОР;
- реализация стимулирующего эффекта динорфина А на ЛС осуществляется при рекрутировании Ca^{2+} из внутриклеточных хранилищ, при этом вклад IP_3 -рецепторов наиболее выражен.

ГЛАВА 5. ИЗМЕНЕНИЕ СОКРАТИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ЛИМФАТИЧЕСКИХ СОСУДОВ ПОСЛЕ РЕГУЛЯРНЫХ ФИЗИЧЕСКИХ НАГРУЗОК И НА ФОНЕ ВЛИЯНИЯ β -ЭНДОРФИНА

Более 80 лет назад экспериментально было установлено, что различные повреждающие агенты, такие как холод, хирургическое вмешательство, спинальный шок, избыточная мышечная нагрузка и другие, вызывают сходные неспецифические морфологические и функциональные изменения в организме. К ним относятся инволюция тимуса, селезенки и лимфоузлов, гиперемия и гиперплазия коры надпочечников, эрозии ЖКТ и ряд других проявлений [239]. Выявленные наблюдения были обобщены канадским физиологом Г. Селье как признак срочной адаптации организма к чрезмерным по силе раздражителям, а сам феномен получил название «общий адаптационный синдром» [237]. Получившее всеобщее признание концепция общего адаптационного синдрома получила дальнейшее развитие. В результате было предложено различать «эустресс» и «дистресс». Эустресс представляет собой адаптивную реакцию, приводящую к повышению эффективности деятельности организма, в то время как дистресс формируется при достижении критического порога истощения и оказывается причиной повреждения органов и тканей, что ведет к развитию «болезней адаптации». Переход эустресса в дистресс возможен под действием экзо- и эндогенных факторов, природа которых долгое время оставалась неизученной [238]. В 80-х годах прошлого века отечественными учеными было признано существование эндогенных механизмов, названных «стресс-лимитирующими системами», которые препятствуют переходу эустресса в дистресс и возникновению «болезней адаптации». Одной из таких «стресс-лимитирующих систем», наряду с антиоксидантной, серотонинергической, ГАМК-ергической и комплексом простагландинов, является эндогенная опиоидная система [36].

Опиоидная система способствует снижению секреции гормонов, уровень которых в крови повышается при стрессе. К их числу относятся гормоны

гипоталамо-гипофизарной системы: АКТГ, альдостерон, вазопрессин, кортизол, катехоламины. При этом повышается содержание в крови тех гормонов, концентрация которых в плазме крови при экстремальных воздействиях на организм снижается – инсулина, тестостерона, трийодотиронина и тироксина [29]. Таким образом, ЭОС может рассматриваться в качестве модулятора в отношении гормональной системы. Зарегистрированный антиульцерогенный эффект опиоидов, который зависит от продукции циклооксигеназы и блокируется индометацином, также можно отнести к стресс-лимитирующим эффектам ЭОС [114], так же, как и кардиопротекторный эффект ЭОС, обнаруженный группой отечественных ученых [26]. Позднее эти же исследователи доказали, что кардиопротекторный эффект ОП связан с активацией периферических ОР [28]. Поскольку ЛС и сердце обладают сходством регуляторных механизмов, подробно описанных в главе 1, можно предположить модулирующее функции лимфатической системы действие ЭОС при воздействии стрессовых факторов. Для изучения данного предположения была реализована модель регулярных физических нагрузок, как стрессового фактора. При этом экспериментальные животные подвергались ежедневной тренирующей нагрузке на тредбане в течение 21 суток. По окончании исследования выполнялся бег до полного утомления, после чего животные использовались в эксперименте. Более подробно методика тренировки животных описана в главе 2 «Материалы и методы исследования».

Были проанализированы показатели сократительной активности сосудистых объектов брыжеечного лимфатического протока (n=100) нетренированных самцов белых крыс – интактные сосуды (использовались фоновые данные, полученные при изучении влияния β -эндорфина до введения вазоактивных препаратов в рабочую камеру миографа) и 63 ЛС тренированных белых крыс. Важно отметить, что спонтанная фазная сократительная активность ЛС, выделенных у нетренированных животных регистрировалась у 81% сосудистых препаратов; у тренированных животных – у 100% изучаемых объектов. Показатели сократительной активности изолированных ЛС, выделенных у нетренированных и тренированных белых крыс, представлены в Таблице 5.1.

Таблица 5.1 – Показатели сократительной активности изолированных ЛС, выделенных у нетренированных и тренированных белых крыс. Представлены абсолютные данные в виде $M \pm SD$

Группы животных	n	ЧС, min^{-1}	Амплитуда, mN	Производительность, у.е.	Тонус, mN
Нетренированные крысы	100	$8,64 \pm 0,51$	$0,69 \pm 0,04$	$103,59 \pm 7,1$	$0,85 \pm 0,11$
Тренированные крысы	63	$7,84 \pm 0,53$	$0,60 \pm 0,03$	$99,85 \pm 7,29$	$1,56 \pm 0,08^{**}$

Примечание – **– статистически значимые различия по сравнению со значениями нетренированных крыс при $p \leq 0,01$

Полученные результаты показывают, что параметры сократительной активности ЛС тренированных и нетренированных животных имеют некоторое различие. Так, частота и амплитуда сокращений ЛС в группе тренированных животных несколько ниже, чем в группе нетренированных животных, тогда как тоническое напряжение сосудов статистически значимо увеличено (в 1,8 раза), что может являться причиной меньшего заполнения ЛС в диастолу. Выявленные изменения показателей сократительной активности брыжеечных ЛС тренированных животных, как следствие, приводили к снижению минутной производительности и, вероятно, уменьшению объема перекачиваемой лимфы.

5.1 Сократительная активность лимфатических сосудов тренированных крыс при действии β -эндорфина

В данной части исследования целью являлось установление возможных различий в чувствительности ЛС к действию ЭОП при действии стрессора, в качестве которого использована интенсивная физическая нагрузка преимущественно аэробной мощности. Использование β -эндорфина для оценки его влияния на эффективность сократительной активности ЛС при физической нагрузке была продиктована тем обстоятельством, что его уровень в крови, и, вероятно, в лимфе, существенно возрастает при стрессовых воздействиях. В частности, при аэробной физической нагрузке, интенсивность которой превышала порог 60% $\text{VO}_{2\text{max}}$ (максимальное потребление кислорода), содержание β -

эндорфина в крови после 10-минутного бега возрастает на 42%, а через 20 минут – на 110% [137].

Сосудистые объекты, выделенные от экспериментальных животных, тренированных на тредбане, подвергались воздействию β -эндорфина в диапазоне концентраций 10^{-12} – 10^{-8} М. Полученные данные представлены в Таблице 5.2.

Таблица 5.2 – Изменение показателей сократительной активности ЛС тренированных крыс на фоне воздействия β -эндорфина. Данные представлены в относительных единицах по отношению к фону в виде $M \pm SD$, $n=10$

β -эндорфин, М	Частота сокращений	Амплитуда сокращений	Производительность	Тонус
1×10^{-12} М	$1,09 \pm 0,01^*$	$1,03 \pm 0,02$	$1,03 \pm 0,03$	$1,01 \pm 0,01$
1×10^{-11} М	$1,18 \pm 0,02^{**}$	$1,06 \pm 0,02^*$	$1,07 \pm 0,04^*$	$1,00 \pm 0,02$
1×10^{-10} М	$1,22 \pm 0,02^{**}$	$1,04 \pm 0,03^*$	$1,12 \pm 0,06^*$	$1,00 \pm 0,03$
1×10^{-9} М	$1,20 \pm 0,02^{**}$	$1,09 \pm 0,03^*$	$1,15 \pm 0,06^*$	$0,98 \pm 0,03$
1×10^{-8} М	$1,21 \pm 0,06^*$	$1,08 \pm 0,03^*$	$1,17 \pm 0,08^{**}$	$0,98 \pm 0,03$
Примечание –*, **– статистически значимые отличия по сравнению с фоновыми значениями ($p \leq 0,05$; $p \leq 0,01$).				

Согласно полученным результатам, характер ответной реакции ЛС, выделенных от тренированных животных, существенным образом отличался от интактных сосудов. Так, пороговая концентрация β -эндорфина, вызывающая сосудистую реакцию ЛС тренированных животных, составила 10^{-12} М, что на порядок меньше, чем у нетренированных животных. Следующее важное различие заключалось в том, что в диапазоне концентраций 10^{-12} – 10^{-8} М влияние ОП приводило к независящему от концентрации повышению как амплитуды, так и частоты сокращений. В среднем, повышение ЧС составило 18%, амплитуды сокращений 6% от фона. Стимулирующий насосную функцию эффект наблюдался при действии β -эндорфина во всем исследованном диапазоне концентраций, и эти изменения были статистически значимы. Повышение минутной производительности носило дозозависимый характер, с максимумом при действии β -эндорфина в концентрации 1×10^{-8} М – на 17% ($p \leq 0,01$).

Тоническое напряжение при действии β -эндорфина на ЛС регистрировалось на уровне фоновых значений.

Таким образом, полученные данные, демонстрирующие стимулирующее действие β -эндорфина на ЛС тренированных животных, существенно различаются с показателями, полученными при воздействии β -эндорфина на ЛС интактных животных, когда наблюдался угнетающий сократительную активность эффект при действии β -эндорфина в диапазоне концентраций – 10^{-11} – 10^{-8} М (Таблица 4.1). Зарегистрированное снижение минутной производительности являлось следствием снижения частоты сокращений ЛС, тогда как амплитуда одиночных сокращений имела слабо выраженную тенденцию к увеличению, что, вероятно, являлось следствием большего заполнения лимфангиона в диастолу при снижении частоты фазных сокращений.

5.2 Изучение механизмов действия β -эндорфина на лимфатические сосуды крыс, подвергавшихся регулярной физической нагрузке

При изучении механизмов действия β -эндорфина на ЛС интактных животных, изложенных в главе 4, было выяснено, что ОП реализует эффект посредством взаимодействия с μ - и δ -ОР. Для выяснения, сохраняется ли налоксон-зависимость при стрессовых воздействиях, были проведены эксперименты с использованием неселективного блокатора ОР налоксона, который использовался в концентрации 1×10^{-6} М. В этой концентрации антагонист ОР не оказывал влияния на моторику ЛС. Для повышения объективности сопоставления полученных результатов в экспериментах использовалась та же концентрация β -эндорфина, что и при изучении механизмов действия на интактных ЛС – 1×10^{-9} М. Кроме того, в этой концентрации проявлялся субмаксимальный, достоверный эффект изучаемого пептида на ЛС тренированных животных. В Таблице 5.3 приведены параметры сократительной активности изолированных ЛС тренированных животных при действии β -эндорфина на фоне налоксона.

Таблица 5.3 – Параметры сократительной активности изолированных ЛС тренированных животных при действии β -эндорфина на фоне налоксона по отношению к фону. Данные представлены в относительных единицах в виде $M \pm SD$, $n=10$

ОП, блокатор ОР	Частота сокращений	Амплитуда сокращений	Производительность	Тонус
β -эндорфин, 10^{-9} М	$1,21 \pm 0,02^{**}$	$1,08 \pm 0,01^*$	$1,16 \pm 0,05^*$	$0,99 \pm 0,03$
Налоксон 10^{-6} М+ β -эндорфин	$1,03 \pm 0,01\#$	$1,00 \pm 0,02$	$1,01 \pm 0,03\#$	$0,98 \pm 0,05$
Примечание – * – статистически значимые различия по сравнению с фоновыми значениями ($p \leq 0,05$); # – статистически значимые различия по сравнению с изолированным применением β -эндорфина ($p \leq 0,05$)				

Согласно представленным в Таблице 5.3 данным, на фоне налоксона стимулирующий эффект ОП не проявляется. Этот факт позволяет сделать вывод, что стимулирующее влияние β -эндорфина является налоксон-зависимым, т.е. опосредовано ОР.

В результатах экспериментальных исследований, изложенных в главе 4 было показано, что ингибирующий эффект β -эндорфина на интактные ЛС реализуется через μ - и δ -ОР, а стимулирующий эффект эндогенного опиоида динорфина А – через κ -ОР. Известно, что β -эндорфин, как эндогенный агонист, является неселективным и имеет высокое сродство к μ - и δ -ОР, и более низкое – к κ -ОР (Таблица 1.1). Исходя из этого, можно предположить, что полученный стимулирующий моторику ЛС тренированных животных эффект β -эндорфина, вероятно, также может быть реализован через κ -ОР, так как в условиях повышенного «возмущения», коим являются регулярные физические нагрузки (в нашем исследовании – тренировки на тредбане), могут проявляться иные эффекты ОП, реализуемые посредством активации других сигнальных путей. Это послужило основанием для проведения экспериментов по оценке влияния β -эндорфина на ЛС тренированных животных на фоне блокатора κ -ОР nBNI. Антагонист использовался в концентрации 1×10^{-6} М, β -эндорфин – 1×10^{-9} М. Показатели сократительной активности ЛС тренированных животных при действии β -эндорфина на фоне nBNI представлены в Таблице 5.4.

Таблица 5.4 – Показатели сократительной активности ЛС тренированных животных при действии β -эндорфина на фоне nBNI. Данные представлены в относительных единицах по отношению к фону в виде $M \pm SD$, $n=8$

ОП, блокатор ОР	Частота сокращений	Амплитуда сокращений	Производительность	Тонус
β -эндорфин, 10^{-9} М	$1,20 \pm 0,01^{**}$	$1,08 \pm 0,03^*$	$1,16 \pm 0,04^*$	$0,98 \pm 0,02$
nBNI, 10^{-6} М	$0,98 \pm 0,03$	$0,95 \pm 0,02^*$	$0,95 \pm 0,03$	$1,01 \pm 0,01$
nBNI + β -эндорфин	$0,95 \pm 0,04\#$	$0,93 \pm 0,03^{*\#}$	$0,90 \pm 0,04^{*\#}$	$1,02 \pm 0,01$

Примечание – *, ** – статистически значимые различия по сравнению с фоновыми значениями ($p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$); # – статистически значимые различия по сравнению с изолированным применением β -эндорфина ($p \leq 0,05$)

Как следует из данных, приведенных в Таблице 5.3, блокатор к-ОР при его изолированном применении в концентрации 1×10^{-6} М не оказывал влияния на сократительную активность ЛС тренированных животных. Стоит обратить внимание, что эти данные отличаются от результатов, полученных при действии nBNI на ЛС интактных животных, где блокатор стимулировал сократительную активность лимфангионов (Таблица 4.4).

Применение β -эндорфина на фоне блокатора к-ОР на ЛС тренированных крыс не приводило к увеличению параметров сократительной активности лимфангионов. Напротив, наблюдалась тенденция к их снижению. Уменьшение параметров сократительной активности ЛС тренированных животных ниже фоновых показателей при применении блокатора к-ОР и β -эндорфина может быть результатом влияния ОП на другие ОР, предположительно μ -ОР, поскольку на фоне неселективного блокатора ОР налоксона, эффект β -эндорфина не проявлялся (Таблица 5.3). Для проверки данной гипотезы были проведены эксперименты с использованием блокатора μ -ОР СТОР при действии β -эндорфина на ЛС тренированных животных. Антагонист использовался в концентрации 1×10^{-7} М, поскольку в этой концентрации не вызывал изменений сократительной активности ЛС. Показатели сократительной активности ЛС тренированных животных при действии β -эндорфина на фоне СТОР представлены в Таблице 5.5.

Таблица 5.5 – Показатели сократительной активности ЛС тренированных животных при действии β -эндорфина на фоне СТОР. Данные представлены в относительных единицах по отношению к фону в виде $M \pm SD$, $n=8$

ОП, блокатор ОР	Частота сокращений	Амплитуда сокращений	Производительность	Тонус
β -эндорфин, 10^{-9} М	$1,20 \pm 0,01^{**}$	$1,08 \pm 0,03^*$	$1,16 \pm 0,04^*$	$0,98 \pm 0,02$
СТОР+ β -эндорфин	$1,24 \pm 0,02$	$1,07 \pm 0,01^*$	$1,23 \pm 0,03^*$	$1,02 \pm 0,02$
Примечание – *, ** – статистически значимые различия по сравнению с фоновыми значениями ($p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$)				

Как следует из данных, приведенных в Таблице 5.5, сократительная активность ЛС тренированных животных при воздействии β -эндорфина на фоне СТОР более выражена, чем без блокатора μ -ОР. Это является косвенным подтверждением предположения, что β -эндорфин, являясь неселективным эндогенным агонистом, в разных условиях может активировать различные сигнальные пути, взаимодействуя как с μ -ОР, так и с κ -ОР.

Таким образом, на основании полученных результатов можно заключить, что стимулирующий сократительную активность ЛС эффект эндогенного ОП β -эндорфина у тренированных животных реализуется посредством взаимодействия с κ -ОР и активации сигнальных путей, вызванных таким взаимодействием, которые более подробно были рассмотрены в главе 4. Вероятным также представляется, что продолжительные интенсивные физические нагрузки сопровождаются изменением функциональной селективности ОР, в частности, κ -ОР. Несколько более выраженный стимулирующий эффект при действии β -эндорфина на фоне антагониста μ -ОР, вероятно, является свидетельством того, что частичное нивелирование полученного эффекта происходит в результате одновременной активации κ - и μ -ОР, поскольку через μ -ОР реализуется угнетающий сократительную активность ЛС эффект β -эндорфина.

5.3 Обсуждение результатов

Проблема адаптации к факторам окружающей среды интенсивно изучается специалистами различных областей науки, в частности физиологии спорта.

Чрезмерные физические нагрузки, относящиеся к стрессовым факторам, зачастую составляют основу патогенеза различных заболеваний, в том числе сердечно-сосудистых, в основе которых, как полагают, лежит нарушение стабильности электрических процессов в возбудимых тканях. Приспособление к физической деятельности сопровождается комплексом функциональных изменений, который включает как реакцию со стороны сердца, так и сосудов (эндотелий-зависимая вазодилатация) [35]. Однако, при интенсивных физических нагрузках в организме происходит повышенное образование свободнорадикальных соединений, депонирование которых снижает биодоступность оксида азота (NO), что может приводить к дисфункции сосудов и повышению их тонуса [17]. При изучении функционального состояния сосудистого эндотелия спортсменов с помощью анализа уровня различных физиологически активных соединений, участвующих в регуляции сосудистого тонуса, было выявлено смещение баланса этих регуляторов в сторону эндотелина, который, как известно, является сильнейшим вазоконстриктором [34]. В наших экспериментах при анализе параметров сократительной активности ЛС тренированных животных было выявлено повышение тонического напряжения в 1,8 раза ($p \leq 0,01$) по сравнению с ЛС интактных животных (Таблица 5.1). Вероятно, такое изменение тонуса является следствием повышения уровня эндотелина вследствие предъявления высокоинтенсивной физической нагрузки в последний день эксперимента.

Стимуляция эндогенных физиологических механизмов, в частности, эндогенных стресс-лимитирующих систем, к которым относится ЭОС, лежит в основе формирования протективных механизмов, обеспечивающих оптимальное функционирование организма в условиях стресса. Одним из маркеров повышения активности ЭОС при физических нагрузках является повышение уровня эндогенных опиоидов [62, 178, 218]. Кроме того, при физических нагрузках происходит увеличение объема интерстициальной жидкости и, как следствие, площади капиллярной фильтрации и фильтрационного давления [195]. Отводя избыток капиллярного фильтрата, лимфатическая система участвует в нормализации гидростатического давления в интерстициальном пространстве, что

проявляется в ускорении лимфотока [37, 172]. Иными словами, физические нагрузки являются активирующим фактором, способствующим увеличению моторной (транспортной) функции лимфатической системы. Таким образом, при воздействии физической нагрузки активизируются и ЭОС, и лимфатическая транспортная функция. Для изучения влияния эндогенных опиоидов на лимфатические сосуды при физических нагрузках была реализована модель регулярных физических нагрузок на белых крысах, с последующей оценкой сократительной активности брыжеечных ЛС под влиянием β -эндорфина – ОП, уровень которого повышается при действии стрессовых факторов.

На Рисунке 5.1 графически представлено выявленное разнонаправленное действие β -эндорфина на ЛС тренированных и нетренированных животных. В качестве наиболее информативного показателя приведено изменение минутной производительности ЛС под действием β -эндорфина в изучаемом диапазоне концентраций.

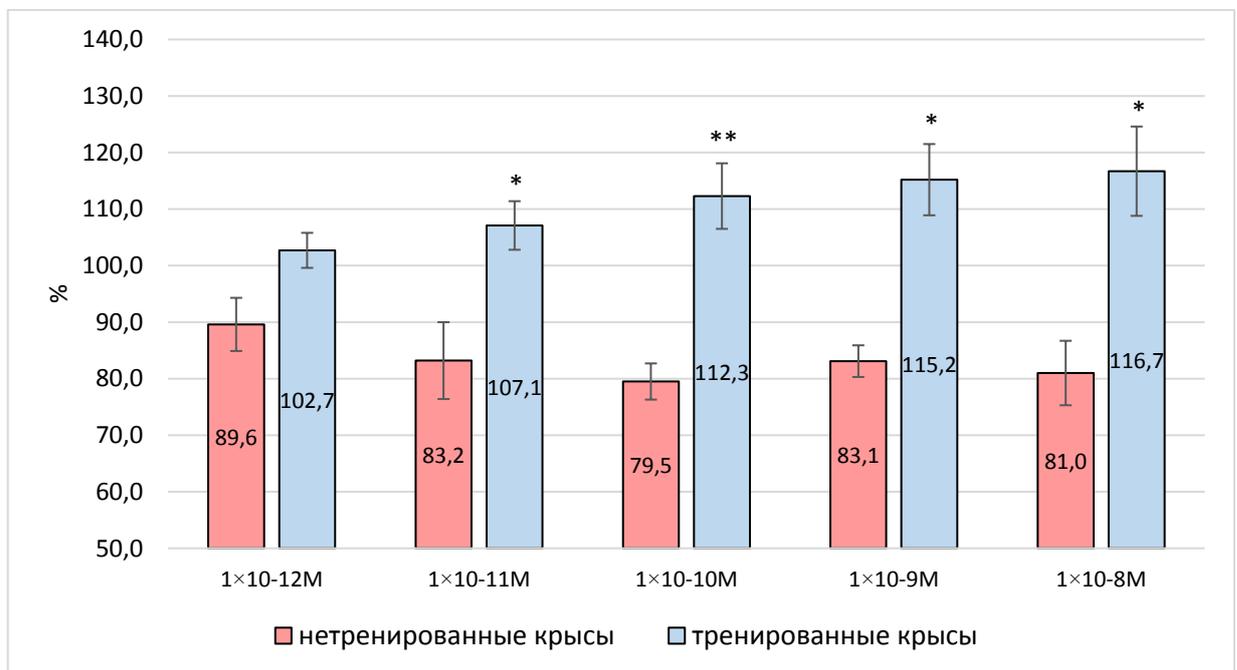


Рисунок 5.1 – Изменение минутной производительности при действии β -эндорфина на изолированные брыжеечные ЛС тренированных и нетренированных белых крыс. Данные представлены в % в виде $M \pm SD$.

*, ** – статистически значимые отличия по сравнению с ЛС нетренированных крыс ($p \leq 0,05$; $p \leq 0,01$)

Установлено, что стимулирующий эффект β -эндорфина на ЛС тренированных животных является налоксон-зависимым (Рисунок 5.2) и реализуется через к-ОР. Участие к-ОР в стимулирующих моторику реакциях ОП находит подтверждение данными, полученными при воздействии на ЛС эндогенного к-агониста динорфина А (Таблица 4.14), при влиянии которого в концентрациях 10^{-11} – 10^{-9} М также регистрировалось увеличение показателей сократительной активности.

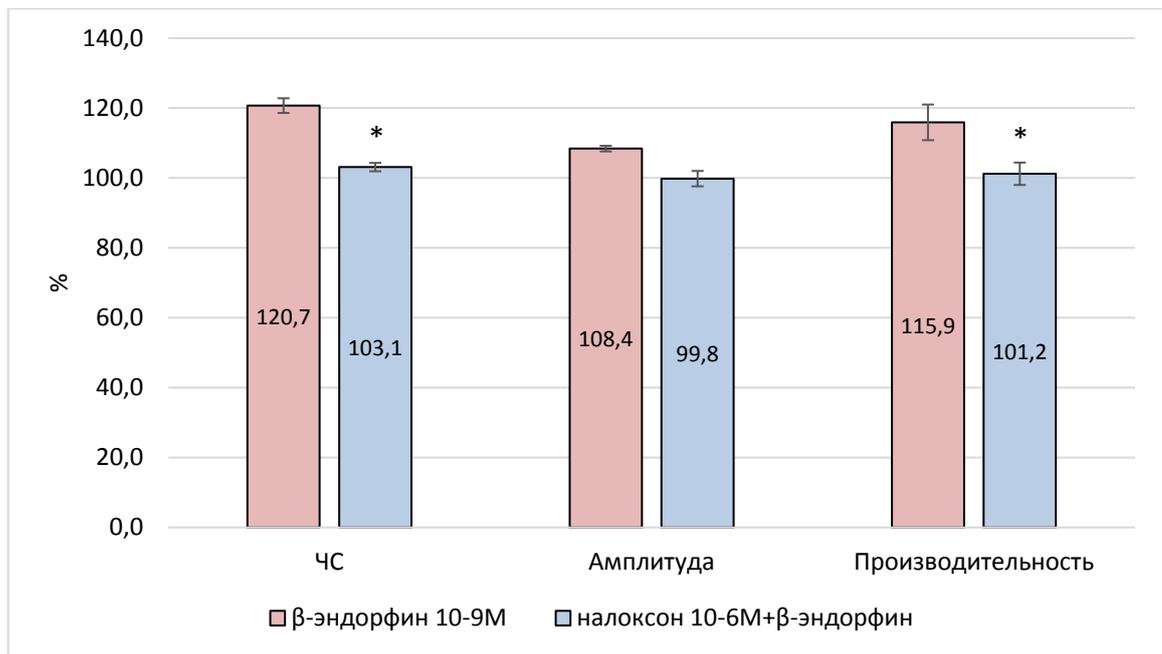


Рисунок 5.2 – Изменение параметров сократительной активности брыжеечных ЛС, тренированных животных при действии β -эндорфина на фоне налоксона. Данные представлены в % в виде $M \pm SD$. * – статистически значимые отличия по сравнению с изолированным применением β -эндорфина ($p \leq 0,05$)

Выявленное снижение показателей сократительной активности ЛС тренированных животных ниже фоновых значений при действии β -эндорфина на фоне блокатора к-ОР, может являться результатом взаимодействия ОП с μ -ОР, что подтверждается результатами, полученными на фоне СТОР – блокатора μ -ОР (Рисунок 5.3).

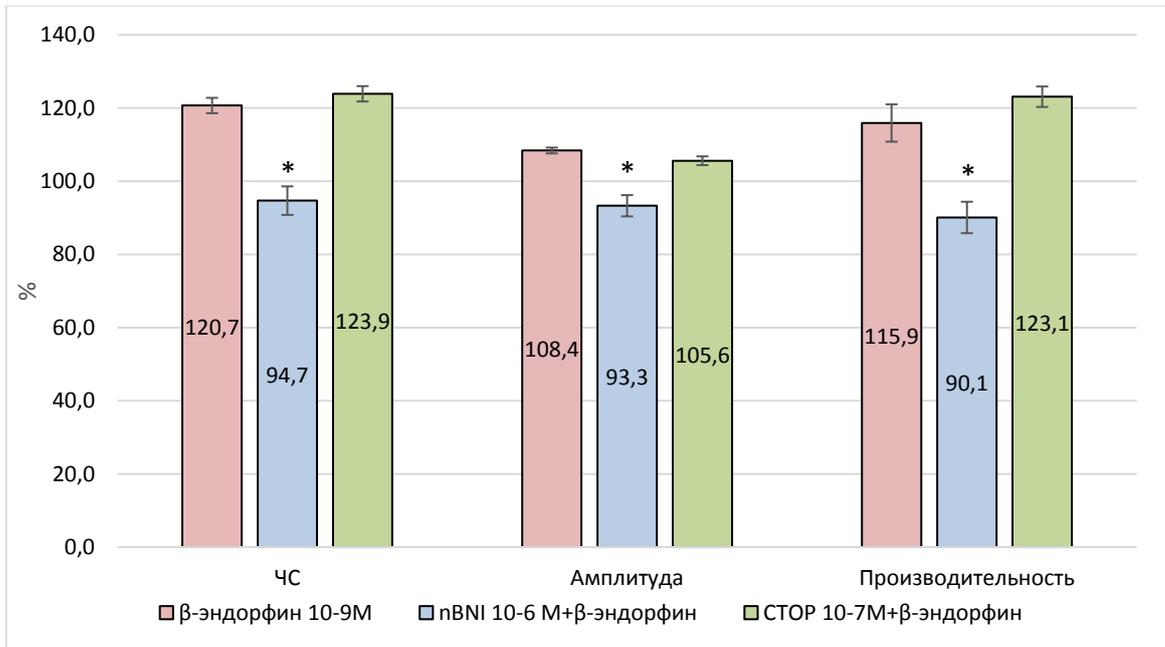


Рисунок 5.3 – Изменение параметров сократительной активности брыжеечных ЛС, тренированных животных при действии β-эндорфина на фоне блокаторов ОР. Данные представлены в % в виде $M \pm SD$. * – статистически значимые отличия по сравнению с изолированным применением β-эндорфина при $p \leq 0,05$

Таким образом, полученное разнонаправленное действие β-эндорфина на ЛС нетренированных и тренированных животных реализуется через различные ОР, посредством активации различных сигнальных путей.

Вероятным механизмом формирования разнонаправленного действия β-эндорфина на ЛС интактных и тренированных животных может являться так называемый «смещенный агонизм» – лиганд-направленная передача сигналов рецептора, или функциональная селективность. К возникновению разнонаправленных эффектов одного и того же лиганда может приводить его способность избирательно и предпочтительно активировать специфические сигнальные пути. Одним из таких отклонений от «канонического пути» передачи сигнала, является образование гомо- и гетеродимеров GPCR, к числу которых относятся и ОР. При этом такие белковые взаимодействия на мембранном уровне могут приводить к ослаблению, усилению или даже изменению типа внутриклеточной передачи сигналов, запускаемой специфическими стимулами или их комбинацией [156]. В экспериментах на очищенных GPCR класса А (родопсиноподобные рецепторы) было продемонстрировано, что в строго

контролируемых условиях мономера GPCR достаточно для активации G-белка, а димеризация модулирует функцию рецептора [104]. При гомодимеризации рецепторов происходит модулирование силы функции рецептора, сцепленного с G-белком, и внутриклеточного транспорта [183]. При гетеродимеризации рецепторов могут изменяться сигнальные пути, например, путем активации различных G-белков. Гетеродимеризация может приводить к потенцированию сцепления с G-белком и усилению последующего эффекта или, в качестве альтернативы, к уменьшению сцепления с G-белком и ослаблению последующего эффекта. Кроме того, гетеродимеризация может привести к переключению в связывании с G-белком и изменению продукции вторичных мессенджеров [177].

Это в полной мере можно отнести и к ОР. В последнее десятилетие изучению проявления смещения передачи сигналов как эндогенными ОП, так и синтетическими опиоидами посвящен ряд исследований [73, 74]. Было обнаружено, что в клетках, стабильно экспрессирующих крысиные κ -ОР, большинство κ -рецепторов существуют в виде димеров, обработка которых агонистами не индуцирует мономеризацию. В результате гетеродимеризации двух полностью функциональных ОР – κ - и δ -ОР формируется «новый» рецептор, который проявляет связывание с лигандом и функциональные свойства, отличные от свойств каждого отдельного рецептора. При сравнении лигандсвязывающих свойств κ - δ -гетеродимера с лигандсвязывающими свойствами κ - или δ -ОР и исследовании способности высокоселективных агонистов и антагонистов конкурировать с ^3H -дипренорфином (неселективным антагонистом опиоидов) в мембранах клеток, экспрессирующих κ - или δ -, либо оба, и κ -, и δ -ОР, было обнаружено, что κ -ОР обладает высоким сродством к κ -селективному агонисту U69593, и антагонисту nBNI. Аналогично, δ -ОР обладал высоким сродством к δ -селективному агонисту DPDPE и антагонисту TIPPФ. κ - δ -гетеродимер, напротив, не проявлял значительного сродства ни к κ -, ни к δ -селективным агонистам или антагонистам. Однако при одновременной обработке клеток обоими агонистами κ - δ -гетеродимер синергически связывал высокоселективные агонисты и активировался этими лигандами, проявляя потенцирование внутриклеточных

сигнальных путей. К частично селективным лигандам κ - δ -гетеродимер также проявлял сильное сродство и усиливал передачу сигнала [163]. В другом исследовании было продемонстрировано, что отдельно μ - или δ -ОР, действуя через $G_{\alpha i/0}$, угнетают Ca^{2+} каналы и аденилатциклазу, активируют K^+ каналы. А гетеродимер этих рецепторов трансдуцирует сигнал через $G_{\alpha q}$ -субъединицу, активируя фосфолипазу С и повышая концентрацию внутриклеточного Ca^{2+} [103, 144]. Таким образом, внутриклеточный механизм трансдукции сигнала, а соответственно и эффект, при активации димера может проявляться совершенно отличным от эффекта одиночного рецептора. Косвенно этот факт подтверждается применением блокатора κ -ОР nBNI на брыжеечных ЛС. Так при его применении на ЛС интактных животных блокатор стимулировал сократительную активность лимфангионов (Таблица 4.4), вероятно, в результате взаимодействия с мономером κ -ОР. А при применении блокатора на ЛС тренированных животных, nBNI не оказывал влияния на сократительную активность (Таблица 5.3), вероятно, за счет взаимодействия с гомодимером κ -ОР или гетеродимером κ -, δ - и/или μ -ОР.

Таким образом, в ходе экспериментальных исследований было установлено:

- β -эндорфин в диапазоне концентраций 10^{-12} – 10^{-8} М оказывает стимулирующее влияние на сократительную активность ЛС тренированных животных;
- полученные данные противоположны эффекту, зарегистрированному при воздействии β -эндорфина на ЛС интактных животных, когда наблюдалось угнетение сократительной активности при действии ОП в том же диапазоне концентраций;
- стимулирующий эффект β -эндорфина на ЛС тренированных животных является налоксон-зависимым и реализуется через κ -ОР;
- возможной причиной возникновения разнонаправленного действия β -эндорфина на ЛС интактных и тренированных животных может быть гомо- и/или гетеродимеризация ОР, возникающие на фоне физических нагрузок, как стрессового фактора.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Лимфатическая система, составной частью которой является сеть специализированных сосудов, обеспечивает транспорт ультрафильтрата и электролитов из интерстиция в системную циркуляцию, резорбцию липидов и олигопептидов, а также иммунную защиту организма. Дисфункция лимфатических сосудов, до недавнего времени ассоциирующаяся преимущественно с лимфедемой и воспалением, выявлена при таких состояниях, как ожирение, гипертония, атеросклероз, болезнь Крона, а также при болезни Альцгеймера [264]. Лимфатическая система является активным участником основных физиологических и патофизиологических процессов, происходящих в организме. В отличие от системы кровообращения, в которой центральным насосом является сердце, активное перемещение лимфы осуществляется за счет работы лимфангионов – отдельных сегментов ЛС, ограниченных клапанами и содержащих в стенке ГМК. Обладая способностью к спонтанной сократительной активности, они обеспечивают перемещение своего содержимого из дистальнее расположенного в проксимальный сегмент в циклическом режиме. ГМК сегментов лимфатических сосудов рассматриваются как объекты, сходные по параметрам сократительной, в частности, фазной активности, а также определенной общностью регуляторных механизмов с кардиомиоцитами [158, 221].

Сократительная активность коллекторных ЛС играет важную роль как в продвижении лимфы в центрипетальном направлении, так и в обеспечении эффективного её поступления в инициальные сосуды и капилляры посредством формирования переменного градиента гидростатического давления между интерстицием и лимфатическими капиллярами. Спонтанная сократительная активность ЛС подвержена существенному влиянию регуляторных систем организма, и это является одним из ведущих факторов поддержания гомеостаза при действии «возмущающих», или стрессорных факторов [22]. При этом стресс рассматривается как любое серьезное возмущение физиологического гомеостаза:

операционные вмешательства, болевое воздействие, интенсивные физические нагрузки и т.д.

В ряду регуляторных механизмов, обеспечивающих стрессоустойчивость организма и препятствующих переходу «эустресса» в «дистресс», значительная роль принадлежит эндогенной опиоидной системе. ЭОС, модулируя многочисленные физиологические процессы в организме, участвует в противодействии влиянию стресса [260, 273]. ЭОС противодействует кардинальным влияниям и «возвращает все на свои места», то есть участвует в модуляции стрессовых реакций, что позволяет её отнести, наряду с антиоксидантной, серотонинергической, ГАМК-ергической и комплексом простагландинов, к «стресс-лимитирующей системе».

Эндогенная опиоидная система включает в себя специфические ОР, ОП, а также ферменты, осуществляющие их синтез и инактивацию. Эффекты опиоидэргической системы, согласно традиционным представлениям, реализуются посредством взаимодействия ОП со специфическими мембранно-связанными ОР, относящимися к семейству GPCR. ОП и их специфические рецепторы широко распространены в организме, преимущественно в различных отделах центральной и периферической нервной системы [72, 277], что первоначально позволило рассматривать их в качестве компонентов антиноцицептивной системы [61]. При дальнейших исследованиях ОР была выявлена их экспрессия в периферических органах, таких как легкие, сердце, печень, органах желудочно-кишечного тракта, репродуктивной системы [70, 142, 289]. Обнаружено их участие в регуляции функций дыхательной, сердечно-сосудистой систем, иммунного ответа, регуляции ионного баланса [98, 99, 213, 285]. Опиоидные агонисты заявлены как антиангиогенные факторы развития сосудов и опухолей [266]. ОП принимают участие в регуляции функций желудочно-кишечного тракта [22], выполняя роль транмиттеров. Кроме того, было обнаружено их выраженное влияние на когнитивные функции (память, способность к обучению), участие в процессах терморегуляции, регуляции аппетита, полового поведения, участие в стресс-реализующих механизмах. Одной

из наиболее значимых функций ОП является опосредованная нейро- и кардиопротекция [52, 244]. Широкое распространение в организме и многообразие функций обосновывают принадлежность опиоидов к классу регуляторных пептидов.

Эндогенные опиоиды и рецепторы к ним идентифицированы в структурах сердечно-сосудистой системы. Исследования влияния ОП на объекты сердечно-сосудистой системы, продолжающиеся уже 3-е десятилетие, позволили установить, что клетки миокарда способны к синтезу, хранению и высвобождению ОП [27, 52, 70], а содержание ОП в миокарде сопоставимо с их уровнем в нейрональной ткани [178]. Активация μ -, $\delta_{1,2}$ - и κ_1 -ОР эндо- и экзогенными опиоидами повышает устойчивость сердца к действию ишемии-реперфузии, и кардипротекторный эффект опиоидов в большинстве случаев связан с активацией периферических ОР. Агонисты δ_1 - и κ_1 -ОР могут оказывать отсроченный кардиопротекторный эффект, а активация δ - и κ_1 -ОР способствует уменьшению интенсивности апоптоза кардиомиоцитов после реперфузии [44].

Разнообразие функций ОП выполняемых в организме, определяется многообразием механизмов действия опиоидов. Активация ОР приводит к запуску целого каскада биохимических превращений, вызывающих ответную реакцию клетки. G-белок-опосредованный механизм передачи сигнала ОР относится к общепринятым или «каноническим» и включает в себя закрытие потенциалзависимых кальциевых каналов, стимуляцию оттока калия, ведущую к гиперполяризации, снижение продукции ц-АМФ посредством ингибирования АЦ, что в совокупности приводит к снижению возбудимости клеток [179]. Есть данные о том, что за счет стимуляции μ -ОР усиливается активность NOS и высвобождение NO [190] и, как следствие, увеличение содержания ц-ГМФ – вторичного мессенджера, опосредующего действие NO на клетку. Опиоиды могут увеличивать внутриклеточный пул Ca^{2+} , высвобождая его внутриклеточные запасы путем активации фосфолипазы C, которая, в свою очередь индуцирует образование вторичных мессенджеров IP_3 и ДАГ [164], что наблюдалось в изолированных кардиомиоцитах крысы при активации δ -ОР [169].

При этом в научной литературе последнего десятилетия описаны иные («неканонические») механизмы передачи сигнала GPCR, в частности – лиганд-направленная передача сигналов рецептора, также называемая функциональной селективностью или смещенным агонизмом [267]. Смещенный агонизм описывает явление, при котором связывание различных лигандов с одним и тем же рецептором на идентичном клеточном фоне приводит к дифференциальной активации клеточных сигнальных путей и, в конечном счете, к различным физиологическим результатам. В последнее десятилетие ряд научных работ посвящен изучению проявления смещения передачи сигналов эндогенными и синтетическими опиоидами, в результате которого доказано существование смещенного агонизма и в системе ОП [73, 74]. Кроме того, ОП способны взаимодействовать с неопиоидными рецепторами. К таким рецепторам относятся налоксон-нечувствительный рецептор β -эндорфина, идентифицированный в перитонеальных макрофагах мыши, NMDA-рецептор, OGF-рецептор и другие. Неопиоидные эффекты, реализуемые через активацию этих рецепторов, в отличие от опиоидных, не отменяются налоксоном.

Таким образом, эндогенные опиоиды контролируют физиологические процессы посредством «классических» механизмов активации ОР, механизмов смещенного агонизма, а также неопиоидного действия, что подчеркивает сложность передачи сигналов в ЭОС, в составе которой экспрессируются множественные ОР и/или высвобождается множество ОП.

Наличие ОР на сарколемме кардиомиоцитов, а также на мембранах эндотелиоцитов и ГМК сосудов, дает основание предполагать наличие ОР в структурах ЛС. Косвенно это подтверждается литературными данными, описывающими влияние ОП на сократительную активность ЛС [15, 49, 50, 54], в которых механизмы действия ОП не рассматривались.

Секретируемые в интерстиций ОП транспортируются в системный кровоток с лимфой посредством их первоначальной абсорбции в лимфатических капиллярах. Экспрессия ОР в ЛС до настоящего времени не исследована. Однако, в экспериментах с использованием селективных антагонистов ОР и благодаря

выделению мРНК транскриптов были обнаружены участки связывания опиоидов на поверхности клеток, составляющих клеточный пул лимфы: моноцитов и лимфоцитов человека, мыши, нейтрофилах крыс [241]. Обнаружено стимулирующее влияние β -эндорфина на пролиферацию лимфоцитов [8], которые способны секретировать широкий спектр про- и противовоспалительных цитокинов. В свою очередь, цитокины могут выполнять роль активатора секреции ОП [181, 231]. Показана способность β -эндорфина, стимулировать продукцию IL-1 β макрофагами мыши [16]. Установлено тормозное влияние приведенных цитокинов на моторику ЛС и узлов [51].

Таким образом, перечень задач данной работы включал: выявление ОР с помощью селективных ОП в структуре ЛС и выявление характера их влияния, на лимфангионы; изучение эффектов, оказываемых эндогенными ОП на ЛС, а также определение их механизмов действия.

Исследования проводились на интактных изолированных сегментах лимфатического брыжеечного протока крысы, обладающих спонтанной активностью. Для выявления различных типов ОР в лимфатических сосудах крысы использовались их селективные синтетические агонисты: DAMGO – агонист μ -ОР, DADLE – агонист δ -ОР и U-69593 – агонист κ -ОР. Поскольку известно, что под влиянием селективных агонистов активируются внутриклеточные сигнальные пути, характерные для эндогенных опиоидов [23, 64, 65], наличие реакций со стороны сократительной активности изолированных лимфангионов в ответ на воздействие опиоидных агонистов расценивалось в пользу экспрессии ОР в ЛС. Было исследовано влияние селективных агонистов ОР в диапазоне концентраций $1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-7}$ М, выбор которого определялся на основании литературных данных о содержании эндогенных опиоидов в организме человека и животных [20, 59, 246, 260]. Сократительная активность ЛС оценивалась по изменениям следующих параметров: частоты и амплитуды фазной активности, уровня тонического напряжения. Для оценки насосной функции ЛС был предложен интегральный показатель – минутная производительность,

рассчитывающийся как «площадь под кривой» (AUC) на миограмме и который, с нашей точки зрения, наиболее адекватно отражал мощность сокращений.

DAMGO – селективный агонист μ -ОР – оказывал угнетающее влияние на сократительную активность брыжеечных ЛС. При этом наблюдалось снижение всех функциональных параметров, но в большей степени минутной производительности. Максимальный эффект регистрировался при его воздействии в концентрации 10^{-9} М, при этом снижение составило 25% от фона ($p \leq 0,05$). DADLE – агонист δ -ОР также оказывал угнетающее влияние на сократительную активность ЛС, но менее выраженное, чем при воздействии DAMGO. Вероятно, действие DADLE реализовано путем его непосредственного действия на гладкомышечные клетки ЛС, поскольку проявлялось в статистически значимом снижении амплитуды сокращений, что сопровождалось уменьшением минутной производительности. Результаты, полученные при воздействии агониста κ -ОР U-69593, отличались от эффектов, вызываемых действием других агонистов: κ -агонист оказывал стимулирующее влияние на сократительную активность ЛС. Увеличение моторики проявлялось в диапазоне концентраций 10^{-10} – 10^{-8} М и происходило, преимущественно, за счет роста ЧС и минутной производительности. Максимальные изменения зафиксированы в концентрации 10^{-9} М. При этом увеличение ЧС составило 13%, минутной производительности 20% от фона ($p \leq 0,05$).

На Рисунке 6.1 представлены изменения минутной производительности, как наиболее информативного показателя, отражающего насосную функцию ЛС, при воздействии селективных агонистов ОР.

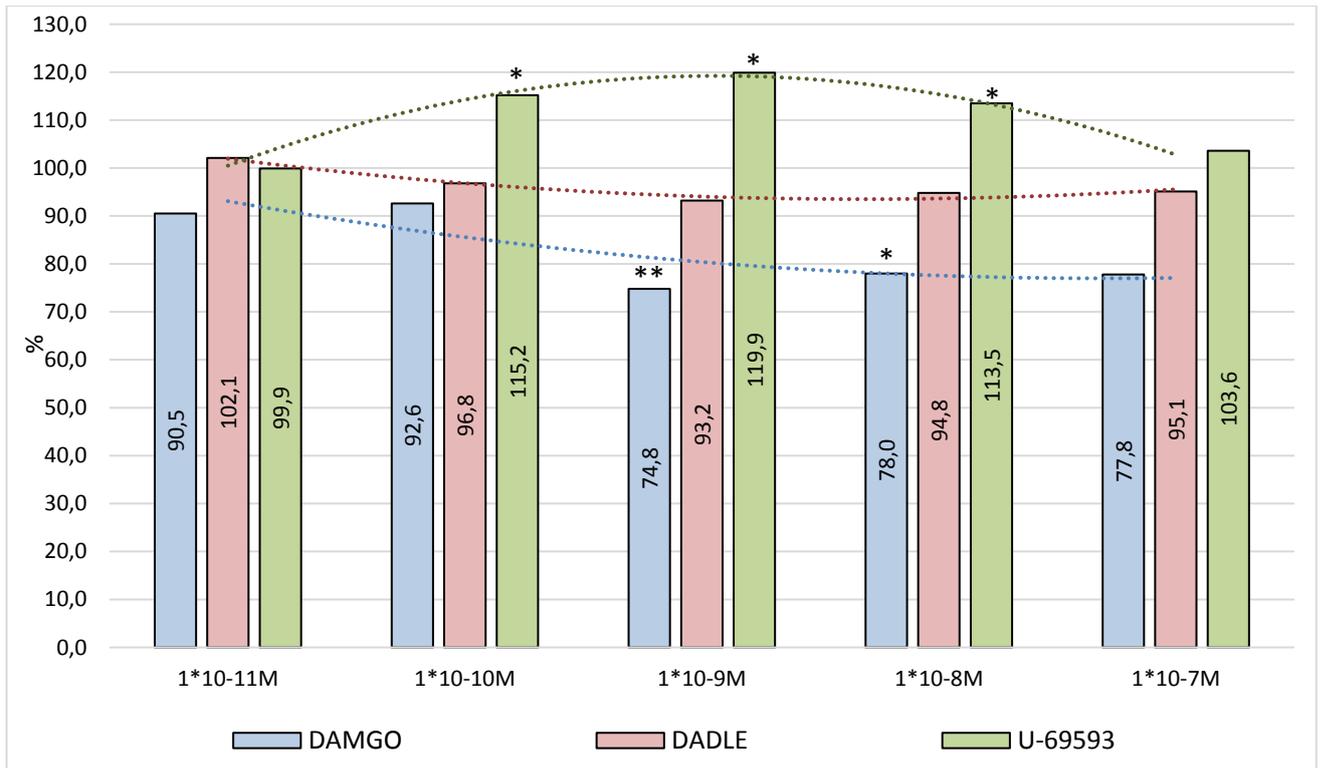


Рисунок 6.1 – Изменение минутной производительности ЛС при воздействии селективных агонистов ОР. Данные представлены в % по отношению к фону в виде М. *, ** – статистически значимые различия по сравнению с фоновыми значениями ($p \leq 0,05$; $p \leq 0,01$)

Выявленная разнонаправленная реактивность ЛС при действии агонистов ОР, является свидетельством активации множественных сигнальных механизмов, вовлекаемых в реализацию биологического эффекта опиоидов.

Результаты экспериментов с применением селективных агонистов ОР явились подтверждением экспрессии рецепторов в брыжеечных ЛС крысы, что послужило основанием для изучения влияния и механизмов действия эндогенных опиоидов, таких как β -эндорфин, ЭМ-1 и динорфин А, на сократительную активность ЛС. Диапазон исследуемых концентраций тестируемых веществ – 1×10^{-12} – 1×10^{-8} М, который включал в себя эндогенный уровень опиоидов в организме человека и животных и определялся на основании литературных данных.

Пороговая концентрация β -эндорфина, вызывающая сосудистую реакцию, составила 10^{-11} М. В диапазоне концентраций 10^{-11} – 10^{-8} М пептид вызывал малозависящее от дозы угнетение сократительной активности ЛС за счет

снижения ЧС, в среднем на 17% от фона, и минутной производительности, в среднем на 18% от фона, которое было статистически значимым. При изучении механизмов действия β -эндорфина было выяснено, что зарегистрированное действие пептида, является налоксон-зависимым и реализуется через μ - и δ -ОР. Тормозный эффект β -эндорфина на моторику ЛС реализуется через активацию потенциал-зависимых, АТФ-чувствительных K^+ -каналов, а также эндотелий-(NO)-зависимых механизмов. Вклад АТФ-чувствительных K^+ -каналов более выражен по сравнению с потенциал-зависимыми.

Применение ЭМ-1 в концентрациях 10^{-10} – 10^{-8} М оказывало стимулирующее влияние на фазную активность лимфангионов: амплитуда и частота одиночных сокращений ЛС имели тенденцию к увеличению и не зависели от концентрации исследуемого вещества. Минутная производительность при применении ОП в этих же концентрациях также увеличивалась независимо от концентрации ЭМ-1. Максимальное увеличение параметра при действии ОП в концентрации 10^{-8} М составило 17% от фона. При изучении механизмов действия, ответственных за полученный эффект ЭМ-1, было выяснено, что стимулирующее влияние пептида налоксон-независимое и связано с активацией NK1-рецепторов (неопиоидное действие). Реализация стимулирующего эффекта ЭМ-1 на брыжеечные ЛС крысы осуществляется за счет рекрутирования ионов Ca^{2+} из внутриклеточных хранилищ посредством рианодиновых и IP_3 -рецепторов.

Применение динорфина А в концентрациях 10^{-11} – 10^{-8} М приводило к стимуляции сократительной активности брыжеечных ЛС за счет увеличения частоты фазных сокращений и минутной производительности. Максимальный эффект был зафиксирован при воздействии динорфина А в концентрации 10^{-10} М и составил 18% и 42% от фона соответственно ($p \leq 0,05$). При изучении механизмов действия динорфина А было выяснено, что полученный стимулирующий эффект пептида является налоксон-зависимым, реализуется через κ -ОР и осуществляется за счет выхода ионов Ca^{2+} из внутриклеточных хранилищ, как через рианодиновые рецепторы, так и IP_3 -рецепторы, при этом вклад IP_3 -рецепторов наиболее выражен.

На Рисунке 6.2 представлены изменения минутной производительности, как наиболее информативного показателя, характеризующего насосную функцию ЛС, при влиянии эндогенных опиоидов в диапазоне изучаемых концентраций.

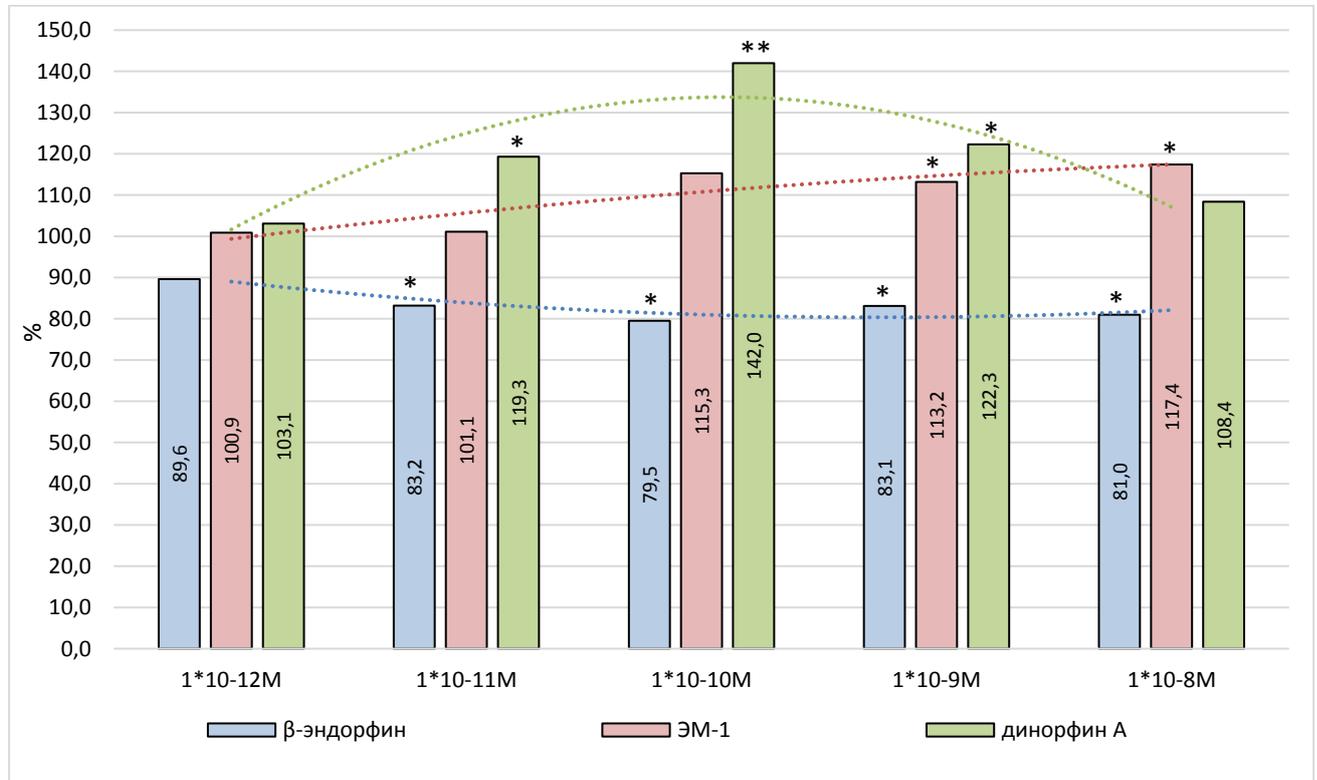


Рисунок 6.2 – Изменение минутной производительности ЛС при воздействии эндогенных опиоидов. Данные представлены в % по отношению к фону в виде М. *, ** – статистически значимые различия по сравнению с фоновыми значениями ($p \leq 0,05$; $p \leq 0,01$)

В результате исследования было выявлено разнонаправленное действие ОП на ЛС. В основе данного явления лежат различные механизмы, активируемые эндогенными опиоидами. Два пептида из трех изученных – β-эндорфин и динорфин А реализуют свои эффекты на брыжеечные ЛС крысы налоксон-зависимым механизмом. При этом β-эндорфин активирует μ- и δ-ОР и угнетает моторику ЛС, а динорфин А реализует стимулирующий эффект через κ-ОР. Стимулирующее влияние ЭМ-1 на сократительную активность ЛС осуществляется налоксон-независимым способом, посредством активации NK1-рецепторов.

При изучении механизмов действия ОП был выявлен интересный факт: в условиях применения Glb (блокатора АТФ-чувствительных калиевых каналов), а также динорфина А, при незначительном изменении параметров одиночных сокращений (амплитуды и частоты сокращений) интегральный показатель сократимости лимфангионов – минутная производительность – характеризовался выраженным достоверным увеличением. По нашему мнению, это связано с изменением паттерна сокращений, которые до воздействия представляли собой чередование одиночных и сгруппированных сокращений, а после воздействия вазоактивного вещества регистрировались только сгруппированные сокращения, в результате чего увеличивалась продолжительность сокращений (Рисунок 4.4, 4.13) и, соответственно, «площадь под кривой» на миограмме. Такое изменение сократительной активности ЛС приводило к увеличению пропульсивной активности лимфангионов. Был сделан вывод, что для адекватной оценки изменения сократительной активности ЛС под влиянием вазоактивных веществ, таких показателей как амплитуда и частота сокращений недостаточно. А предложенный показатель минутной производительности наиболее полно характеризует сократительную активность лимфангиона.

ЭОС, как было сказано ранее, относится к стресс-лимитирующим системам. Модулируя функции организма в период стрессовых ситуаций, ЭОС препятствует переходу эустресса в дистресс и возникновению «болезней адаптации». Кардиопротекторный эффект, оказываемый ОП, относится к защитной функции ЭОС и связан с активацией периферических ОР. Поскольку ЛС и сердце обладают определенной общностью регуляторных механизмов, была высказана гипотеза о возможной модуляции эндогенными опиоидами функций лимфатической системы при воздействии стрессовых факторов. Для изучения данного предположения была реализована модель регулярных физических нагрузок как стрессового фактора. При этом экспериментальные животные подвергались ежедневной тренировке на тредбане в течение трех недель. По окончании исследования выполнялся бег до полного утомления, после чего ЛС животных использовались в эксперименте.

При анализе показателей сократительной активности ЛС тренированных животных были выявлены изменения со стороны тонического напряжения, которые характеризовались увеличением в 1,8 раза ($p \leq 0,01$) по сравнению с ЛС интактных животных. Вероятно, такое изменение тонуса является следствием повышения уровня эндотелина, возникшего в результате регулярных кратковременных (10-минутных) интенсивных физических нагрузок экспериментальных животных. Подобное повышение уровня эндотелина и, как следствие, повышение тонуса сосудов, выявлено у спортсменов под влиянием высоких тренировочных нагрузок [34]. Повышение тонуса ЛС, приводящее к меньшему заполнению лимфангионов в диастолу, наряду с уменьшением показателей фазной активности – частоты и амплитуды сокращений в группе тренированных животных формировали более низкое значение минутной производительности в сравнении с показателем у нетренированных животных (таблица 5.1). Однако известно, что физические нагрузки сопровождаются увеличением объема интерстициальной жидкости и, как следствие, площади капиллярной фильтрации и фильтрационного давления [195]. Отводя избыток капиллярного фильтрата, лимфатическая система на фоне физических нагрузок участвует в нормализации гидростатического давления в интерстициальном пространстве, что проявляется в ускорении лимфотока [37, 172]. То есть, физические нагрузки являются активирующим фактором, способствующим увеличению моторной (транспортной) функции лимфатической системы. Приведенные литературные данные находятся в некотором противоречии с результатами, полученными в нашем исследовании при регистрации сократительной активности изолированных ЛС тренированных животных. Вероятно, это может свидетельствовать о регионарных различиях лимфодинамики и, соответственно, различии локальных регуляторных механизмов. При этом, с учетом увеличения функциональной активности ЭОС при интенсивных продолжительных физических нагрузках, представлялось необходимым выяснить роль эндогенных опиоидов в модуляции моторики ЛС. С

этой целью для исследования был использован β -эндорфин, уровень которого в крови повышается при действии стрессовых факторов [62, 218].

Сосудистые объекты, выделенные от экспериментальных животных тренированных на тредбане, подвергались воздействию β -эндорфина в диапазоне концентраций 10^{-12} – 10^{-8} М. Установлено, что пороговая концентрация ОП, вызывающая сосудистую реакцию ЛС тренированных животных, составила 10^{-12} М, что на порядок ниже, чем при воздействии β -эндорфина на ЛС нетренированных животных. При влиянии всего изучаемого диапазона концентраций β -эндорфина наблюдалась стимуляция насосной функции ЛС. Повышение минутной производительности носило дозозависимый характер, с максимумом при действии эндогенного опиоида в концентрации 10^{-8} М – на 17% в сравнении с фоновым показателем ($p \leq 0,01$). Стимулирующее действие β -эндорфина на ЛС тренированных животных, противоположно эффекту, полученному при воздействии β -эндорфина на ЛС интактных животных, когда наблюдалось угнетение сократительной активности ЛС эндогенным опиоидом в том же диапазоне концентраций (Рисунок 6.3).

При изучении механизмов действия β -эндорфина на ЛС тренированных животных было выявлено, что стимулирующий моторику эффект ОП является налоксон-зависимым. Неселективный эндогенный агонист β -эндорфин может активировать различные сигнальные пути, взаимодействуя и с μ -ОР, и с κ -ОР. Было выявлено, что стимулирующий эффект эндогенного ОП реализуется посредством его взаимодействия с κ -ОР, а через μ -ОР реализуется угнетающий сократительную активность ЛС эффект β -эндорфина, в результате чего происходит частичное нивелирование полученного стимулирующего эффекта.

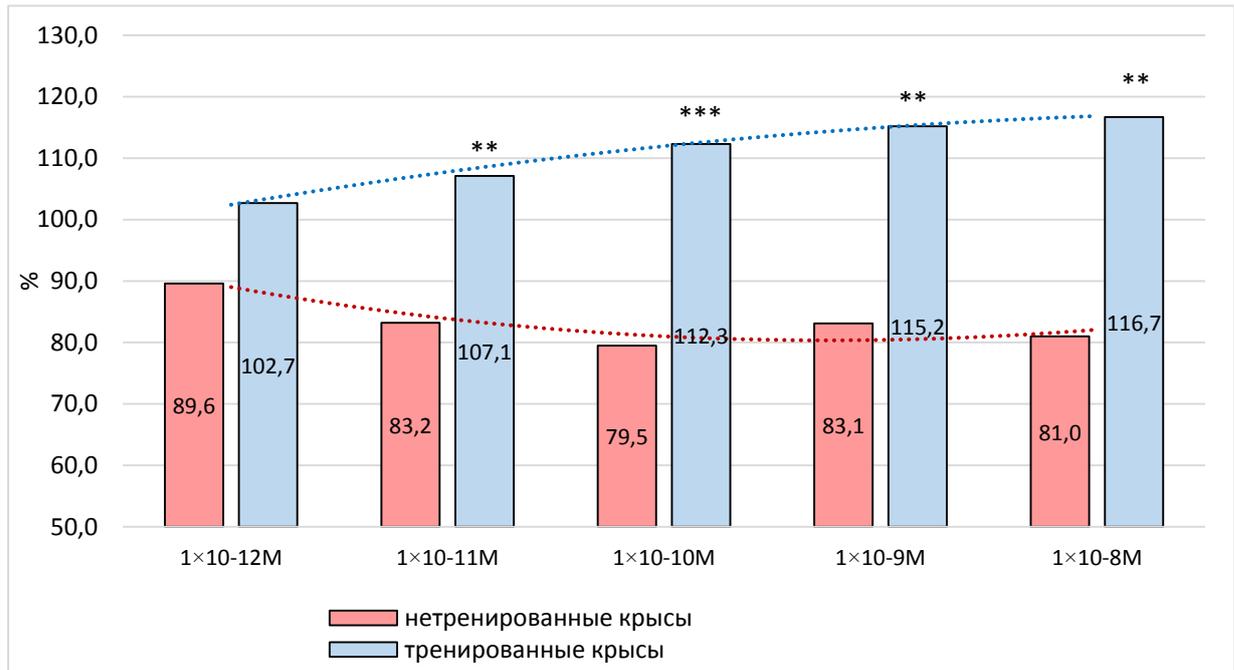


Рисунок 6.3 – Изменение минутной производительности при действии β -эндорфина на брыжеечные ЛС тренированных и нетренированных белых крыс. Данные представлены в % в виде М. **, *** – статистически значимые отличия по сравнению с ЛС нетренированных крыс при $p \leq 0,05$; $p \leq 0,01$

К возникновению разнонаправленных эффектов одного и того же лиганда может приводить его способность избирательно и предпочтительно активировать специфические сигнальные пути – «смещенный агонизм», к числу которого относится образование гомо- и гетеродимеров GPCR. Димерная структура GPCR была подтверждена на живых клетках разными методами, в частности, методом иммунной хроматографии, методом фотоаффинной подвижности, флуоресцентными и биолюминесцентными методами, методами трансмиссивной электронной и атомной микроскопии, вестерн-блоттинг анализом [60, 184, 216]. Такие белковые взаимодействия на мембранном уровне могут приводить к ослаблению, усилению или даже изменению типа внутриклеточной передачи сигналов, запускаемой специфическими стимулами или их комбинацией [156]. В последнее десятилетие изучению проявления смещения передачи сигналов как эндогенными ОП, так и синтетическими опиоидами посвящен ряд исследований [73, 74]. Было найдено, что в результате гетеродимеризации двух полностью функциональных рецепторов – κ -ОР и δ -ОР получается новый рецептор– κ - δ -

гетеродимер, который при связывании с лигандом проявляет функциональные свойства, отличные от свойств каждого отдельного рецептора. Так κ - δ -гетеродимер не проявлял значительного сродства ни к κ -, ни к δ -селективным агонистам или антагонистам. Однако, при одновременной обработке клеток обоими селективными агонистами, κ - δ -гетеродимер синергически связывал высокоселективные агонисты и активировался этими лигандами. К частично селективным лигандам κ - δ -гетеродимер проявлял сильное сродство и усиливал передачу сигнала, проявляя потенцирование внутриклеточных сигнальных путей [163]. Это было подтверждено и в другом исследовании, где μ - δ -гетеродимер также проявлял уникальные свойства: селективные синтетические агонисты (DADLE, DPDPE, DAMGO, морфин) обладали пониженным сродством к μ - δ -гетеродимеру, тогда как эндогенные ОП (ЭМ-1 и лей-энкефалин) обладали повышенным сродством к этому же гетеродимеру [207]. Было высказано предположение, что гетеродимеризация между ОР модулирует передачу сигналов после совместного высвобождения эндогенных ОП, поскольку в структуру ЭОС входит намного больше эндогенных лигандов, чем клонированных рецепторов [163]. А результаты научных исследований, приведенных выше, в которых было установлено, что эндогенные опиоиды обладают более высоким сродством к гетеродимеру ОР, чем любой рецептор по отдельности, подтверждают эту концепцию. Таким образом, гетеродимеры ОР представляют собой новый рецепторный комплекс, обладающий уникальными свойствами связывания с лигандом, эффекторного сопряжения и регуляции передачи сигналов.

Основываясь на вышеизложенном, можно утверждать, что полученное в данном исследовании разнонаправленное действие β -эндорфина на ЛС нетренированных и тренированных животных, реализуется через различные ОР/димеры ОР, посредством активации различных сигнальных путей, тем самым вызывая противоположные эффекты ОП.

В данной работе показано, что ЛС обладают высокой чувствительностью к действию эндогенных опиоидов, а агонист-рецепторные взаимодействия в системе ОП-ОР, возможность взаимодействия ОП с неопиоидными рецепторами,

а также множественность активируемых сигнальных путей лежат в основе широкого разнообразия реализуемых опиоидными пептидами эффектов на ЛС.

ВЫВОДЫ

1. Реактивность брыжеечных ЛС при действии синтетических селективных агонистов ОР свидетельствует о наличии ОР в брыжеечных ЛС крысы. Агонисты μ - и δ -ОР угнетают, агонист κ -ОР стимулирует сократительную активность брыжеечных ЛС крысы. Выявленная разнонаправленная реактивность ЛС при действии агонистов ОР свидетельствует о множественных сигнальных внутриклеточных каскадах, вовлекаемых в реализацию биологического эффекта опиоидов.

2. Бета-эндорфин в диапазоне концентраций 10^{-11} – 10^{-8} М оказывает ингибирующее влияние на сократительную активность брыжеечных ЛС крысы, не зависящее от концентрации. Полученный эффект является налоксон-зависимым и реализуется через активацию μ - и δ -ОР. Угнетающее действие β -эндорфина на моторику ЛС опосредуется эндотелий-(NO)-зависимый механизм и активацией потенциал-зависимых и АТФ-чувствительных K^+ -каналов.

3. Эндоморфин-1 в диапазоне концентраций 10^{-10} – 10^{-8} М оказывает не зависящее от концентрации, стимулирующее влияние на фазную активность брыжеечных ЛС крысы. Стимулирующее влияние пептида является налоксон-независимым и связано с активацией NK1-рецепторов (неопиоидное действие ЭМ-1). Реализация стимулирующего эффекта ЭМ-1 на брыжеечные ЛС крысы осуществляется за счет рекрутирования Ca^{2+} из внутриклеточных хранилищ посредством рианодиновых и IP3-рецепторов.

4. Динорфин А в концентрациях 10^{-11} – 10^{-8} М стимулирует сократительную активность брыжеечных ЛС крысы. Полученный эффект является налоксон-зависимым, реализуется посредством активации κ -ОР и рекрутирования Ca^{2+} из внутриклеточных хранилищ, при участии как

рианодиновых, так и IP_3 рецепторов, при этом вклад IP_3 -рецепторов наиболее значим.

5. Бета-эндорфин в диапазоне концентраций 10^{-12} – 10^{-8} М оказывает стимулирующий эффект на моторику ЛС тренированных животных, который является налоксон-зависимым и реализуется через κ -ОР.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АД – артериальное давление

АКТГ – адренокортикотропный гормон

АТФ – аденозинтрифосфат

АЦ – аденилатциклаза

ГМК – гладкомышечная клетка

ДАГ – диацилглицерид

ДК – дендритные клетки

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

КЛЦМ – киназа легкой цепи миозина

ЛПС – липополисахариды

ЛС – лимфатический сосуд

ЛУ – лимфатический узел

МПП – мембранный потенциал покоя

ОП – опиоидный пептид, опиоидные пептиды

ОР – опиоидный рецептор, опиоидные рецепторы

ПД – потенциал действия

РК – рутениум красный

СК – стволовые клетки

СПР – саркоплазматический ретикулум

ССС – сердечно-сосудистая система

ФЛЦМ – фосфатаза легкой цепи миозина

ц-АМФ – циклический аденозинмонофосфат

ц-ГМФ – циклический гуанозинмонофосфат

ЭМ-1 – эндоморфин-1

ЭОП – эндогенная опиоидная система

4-АР – 4-аминопиридин

5-НТ – 5-гидрокситриптамин (серотонин)

АУС – площадь под кривой (для расчета минутной производительности лимфангиона)

CHO клетки – клетки яичника китайского хомячка (Chinese hamster ovary)

EDHF – гиперполяризующий фактор эндотелия

ET-1 – эндотелин-1

Glb – глибенкламид

GPCR – G-белок-сопряженные рецепторы (G-protein-coupled receptors)

IP₃ – инозитол-1,4,5-трифосфат

IL – интерлейкин

INF – интерферон

nBNI – нор-Биналторфимин (nor-Binaltorphimine)

NK – нейрокинин

NMDA рецептор – ионотропный рецептор глутамата, селективно связывающий N-метил-D-аспартат

NO – оксид азота

NOR – ноцицептивный рецептор

ORL-1 – опиоидподобный рецептор

PGE₂ – простагландин E₂

PGI₂ – простагландин I₂ (простоциклин)

PLC – фосфолипаза C

SDT – спонтанная кратковременная деполяризация (spontaneous transient depolarization)

SP – вещество P (субстанция P)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бахтюков, А.А. Низкомолекулярные аллостерические регуляторы G-белок-сопряженных рецепторов полипептидных гормонов / А.А. Бахтюков, А.О. Шпаков // Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. – 2019. – Т.105, №3.– С.269-283.
2. Борисов, А. В. Анатомия лимфангиона / А. В. Борисов. – Нальчик: Полиграфсервис, 2007. – 296 с.
3. Борисов, А. В. Конструкция лимфангиона в норме и патологии / А.В. Борисов // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2005. – № 2(16). – С. 66-68.
4. Брук, Т. М. Динамика β -эндорфина в крови спортсменов различной квалификации в условиях нагрузки умеренной интенсивности на фоне низкоинтенсивного лазерного воздействия / Т. М. Брук, М. В. Лифке // Курский научно-практический вестник «Человек и здоровье». – 2009. – №2. – С. 5-10.
5. Бубнова, Н. А. Теория активного транспорта лимфы: морфофункциональные основы и клинические аспекты / Н. А. Бубнова, Р. П. Борисова, Н. А. Кубышкина // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2020. – Т.19, №3. – С.80-89.
6. Варианты работы соседних лимфангионов / А. А. Гашев, Р.С. Орлов и др. // Сборник научных трудов ЛСГМИ, Л., – 1990. – С. 56-62.
7. Гашев, А. А. Насосная функция лимфангионов: внутренние механизмы регуляции и возможности фармакокоррекции: автореф. дис. ...доктора мед. наук: 14.00.17 / Гашев Анатолий Анатольевич. – СПб, 2000. – 36 с.
8. Гейн, С. В. Влияние β -эндорфина и селективного агониста μ -опиатных рецепторов DAMGO на пролиферативную активность лимфоцитов / С. В. Гейн, Т. А. Симоненко, В.А. Черешнев // Докл. АН. – 2003. – Т. 391, № 1 – С. 1-3.
9. Гейн, С. В. Динорфины в регуляции функций иммунной системы / С. В. Гейн // Биохимия. – 2014. – Т.79, №5. – С. 509-519.
10. Действие гистамина на спонтанные сокращения брыжеечных лимфатических сосудов и узлов белых крыс. Эндотелийзависимые реакции / С. Г. Петунов, А.А. Егорова и др. // ДАН. – 2010. – Т. 432, № 2 (41). – С. 281–285.
11. Действие тиролиберина на сократительную и электрическую активность изолированных лимфангионов быка / Т. В. Лелекова и др. // Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. – 2002. – № 88 (4). – С. 463-467.
12. Егорова, А. А. Влияние серотонина на лимфатические сосуды белой крысы. Роль эндотелия / А. А. Егорова, С. Г. Петунов, Е. А. Авраменко // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2011. – Т. 10, № 1(37). – С. 79-82.

13. Егорова, А. А. Источники кальция, активируемые гистамином и серотонином при стимуляции сократительной активности лимфатических сосудов белой крысы / А. А. Егорова, С. Г. Петунов, Е. А. Авраменко // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2012. – Т. 11, № 3(43). – С. 64-68
14. Ерофеев, Н. П. Лимфатическая система – необходимый элемент жидкостного гомеостаза организма человека: новый взгляд на старые проблемы (обзор литературы) / Н. П. Ерофеев, Р. С. Орлов // Вестник Санкт-Петербургского университета. – 2008. – Сер. 11, № 4. – С. 78-86.
15. Зверев, М.Д. Действие энкефалинов на сократительную функцию брыжеечных лимфатических сосудов // В кн: Лимфатический сосуд (анатомия, физиология, патология и клиника) / Сб. трудов ЛСГМИ. – Л., 1984.– С.72-75.
16. Зозуля, А. А. Опиоиды и иммунитет / А.А. Зозуля, С.Ф. Пшеничкин // Итоги науки и техники ВИНТИ Сер: Иммунология. – 1990. – Т. 25. – С. 48–120.
17. Изменения функционального состояния сосудистого эндотелия у юных спортсменов различной квалификации / Т. В. Бершова, М. И. Баканов и др. // Российский педиатрический журнал. – 2016. – № 19 (1). – С.14-18.
18. Ковалицкая, Ю. А. Неопиоидное действие β -эндорфина / Ю.А. Ковалицкая, Е.В. Наволоцкая // Биохимия. – 2011. – Т.76, №4. – С. 469-486.
19. Кубышкина, Н. А. Простаглицлин-индуцированные изменения транспортной функции лимфатических сосудов при действии эндотоксинов / Н. А. Кубышкина, А. А. Егорова // Лимфология: от фундаментальных исследований к медицинским технологиям: материалы XII международной конференции, посвященной 25-летию Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии, Новосибирск, 22–23 марта 2016 года. – Новосибирск: Филиал "Гео" Издательства СО РАН, Издательский дом "Манускрипт". – 2016. – С. 119-121.
20. Кунельская, Н. Л. Уровень β -эндорфина, хронический стресс и депрессия при вестибулярной патологии / Н. Л. Кунельская, А. Л. Гусева, С. Д. Чистов // Вестник оториноларингологии. – 2015. – Т. 80, № 1. – С. 12-16.
21. Куприянов, В. В. Лимфатическое звено системы микроциркуляции. / В. В. Куприянов // Физиол. журн. СССР. – 1981. – Т.67, №1. – С.109-120.
22. Курзанов, А.Н. Лиганды опиоидных рецепторов в ракурсе клинической гастроэнтерологии / А.Н. Курзанов // Современные проблемы науки и образования. – 2011. – №6. – С.34-45.
23. Ласукова, Т. В. Агонисты опиоидных рецепторов имитируют феномен "ишемического preconditionирования" сердца: роль циклических нуклеотидов и Ca^{2+} -АТФ-

азы саркоплазматического ретикулума / Т. В. Ласукова, Л. Н. Маслов, А. С. Горбунов // Вестник Томского государственного педагогического университета. – 2010. – № 3(93). – С. 64-69.

24. Левицкая, Н.Г. Регуляторные пептиды / Н. Г. Левицкая, А. А. Каменский // Природа. – 2003. – №10. – С.10-16.

25. Лелекова, Т. В. Роль адренорецепторов в эффекте тиролиберина на лимфатические сосуды / Т. В. Лелекова, Л. Ц. Санжиева // Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. – 2004. – № 90 (1). – С. 32-39.

26. Лишманов, Ю.Б. Использование энкефалинов для предупреждения стрессорного повреждения сердца в эксперименте / Бюлл. exper. биол. и мед. // 1986. – №102 (9). – С.271–272.

27. Лишманов, Ю.Б. Опиатическая регуляция состояния центральной гемодинамики / Лишманов Ю.Б., Маслов Л.Н. // Пат. физ. и эксп. терапия. – 2003. – №1. – С.2-11.

28. Лишманов, Ю.Б. Опиоидергическое звено морфофункциональных изменений миокарда при стрессе и адаптации / Ю. Б. Лишманов, Н. В. Нарыжная, Л. Н. Маслов. – Томск: «Красное знамя», 2003. – 224 с.

29. Лишманов, Ю.Б. Опиоидные нейропептиды, стресс и адаптационная защита сердца / Ю.Б. Лишманов, Л.Н. Маслов. – Томск: изд-во Том. ун-та, 1994. – 352 с.

30. Лобов, Г. И. Механизмы насосной функции лимфангиона: автореф. дис. ... доктора мед. наук: 14.00.17 / Лобов Геннадий Иванович. – СПб, 1993. – 34 с.

31. Лобов, Г. И. Глюкокортикоиды стимулируют сократительную активность лимфатических сосудов и узлов / Г. И. Лобов, Д. В. Унт // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2017. – Т. 16, № 4(64). – С. 73-79.

32. Лобов, Г. И. Саморегуляция насосной функции лимфангиона / Г.И. Лобов, Р.С. Орлов // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 1988. – Т. 74(7). – С. 977-986.

33. Лобов, Г. И. Электрофизиологические свойства мембраны гладкомышечных клеток лимфатических сосудов быка / Г. И. Лобов // Журн. эволюционной биохимии и физиологии. – 1985. – № 3. – С. 271–276.

34. Медиаторы эндотелиальной дисфункции при физическом перенапряжении миокарда у юных спортсменов / И. Е. Смирнов, А. Г. Кучеренко и др. // Российский педиатрический журнал. – 2015.– №5. – С.21-25.

35. Медико-биологические критерии спортивного отбора юных пловцов / В. Л. Гоготова, И. Т. Корнеева, С. Д. Поляков, И. Е. Смирнов // Российский педиатрический журнал. – 2008. – №3. – С.31–6.

36. Меерсон, Ф.З. Стресс-лимитирующие системы и проблема защиты от аритмий / Ф.З. Меерсон // Кардиология. – 1987. – №7. – С.5–12.

37. Микусев, Р. Ю. Влияние статических физических нагрузок на лимфатическую систему: дис. ... канд. мед. наук: 14.00.51, 14.00.16 / Микусев Ростислав Юрьевич. – М., 2007. – 131 с.
38. Опиоидный пептид дельторфин II имитирует кардиопротекторный эффект ишемического preconditionирования: роль δ -опиоидных рецепторов, протеинкиназы C, KATФ-каналов / Л. Н. Маслов, Е. И. Барзах, А. В. Крылатов и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2010. – Т. 149, № 5. – С. 524-527.
39. Орлов, Р. С. Лимфатические сосуды. Структура и механизмы сократительной активности / Р. С. Орлов, А. В. Борисов, Р. П. Борисова. – Л.: Наука, 1983. – 254 с.
40. Петренко, В. М. Структурные основы в сегментарной организации активного лимфооттока / В. М. Петренко // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2005. – Т. 4, № 2(16). – С. 5-12.
41. Петренко, В.М. Структурные основы регуляции сегментарного лимфотока // Межд. журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2013. – № 9. – С. 28-29.
42. Петунов, С. Г. Регуляторные механизмы транспорта лимфы / С. Г. Петунов, Р. С. Орлов, А. И. Кривченко // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2010. – Т9, №3. – С. 4-14.
43. Петунов, С. Г. Влияние глюкокортикоидов на сокращения и электрическую активность лимфатических сосудов / С.Г. Петунов, Р.С. Орлов // Росс. Физ. журнал. – 1997. – Т.83, №3. – С. 59-66.
44. Роль опиоидных рецепторов в регуляции устойчивости сердца к действию ишемии-реперфузии / А. В. Крылатов, О. Е. Ваизова и др. // Рос. физ. журнал им. И.М. Сеченова. – 2017. – Т.103, №3.– С.230-249.
45. Рубцов, А.М. Роль саркоплазматического ретикулаума в регуляции сократительной активности мышц / А. М. Рубцов // Соросовский образовательный журнал. – 2000. – Т. 6, № 9. – С. 17-24.
46. Санжиева, Л. Ц. Прямое и длительное действие тиролиберина в ультрамалых дозах на сократимость лимфатических сосудов белых крыс / Л. Ц. Санжиева, Т. В. Лелекова, И. П. Ашмарин // Радиационная биология и радиационная экология. – 2003. – №43(3). – С. 334–336.
47. Связывание β -эндорфина и его фрагментов с неопиоидным рецептором перитонеальных макрофагов мыши / Ю. А. Ковалицкая, В. Б. Садовников, А. А. Колобов и др. // Биоорганическая химия. – 2008. – Т. 34, № 1. – С. 36-42.
48. Сергеев, П. В. Рецепторы физиологически активных веществ / П.В. Сергеев, Н.Л. Шимановский – М.: Медицина, 1987. – 400 с.

49. Стимуляция лимфотока в микрососудах легких пептидом при остром отеке легких / Д. В. Султанов, В. К. Хугаева, А. В. Ардасенов и др. // Рег. кровообр. и микроцирк. – 2020. – Т. 19. – №3(75). – С. 64-72.
50. Стимуляция лимфотока опиоидными пептидами при острой тонкокишечной обтурационной непроходимости / А. А. Коваленко, В. К. Хугаева, Г. В. Полунин и др. // Успенские чтения: Материалы научно-практической конференции врачей России с международным участием, посвященной 60-летию кафедры общей хирургии Тверского государственного медицинского университета, Тверь, 25–26 сентября 2015 года. Под редакцией Е.М. Мохова. – Тверь: ООО "Издательство "Триада", 2015. – С. 51-52.
51. Унт, Д. В. Механизмы действия интерлейкина-1 β и интерлейкина-2 на транспортную функцию лимфатических сосудов и лимфатических узлов / Д. В. Унт, Г. И. Лобов // Журнал фундаментальной медицины и биологии. – 2017. – № 2. – С. 15-19.
52. Феномен повышения устойчивости сердца к аритмогенному действию ишемии и реперфузии при активации периферических опиатных рецепторов / Л. Н. Маслов, Ю.Б. Лишманов и др. // Вестник аритмологии. – 2002. – №26. – С.77-90.
53. Хугаева, В. К. Влияние даларгина на микрогемо- и микролимфоциркуляцию / В.К. Хугаева // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1988. – № 3. – С. 300-302.
54. Хугаева, В. К. Сократительная активность лимфатических микрососудов и роль опиоидных пептидов в ее регуляции / В.К. Хугаева, В.В. Сучков, М.И. Титов // Физиол. журн. СССР. – 1992. – Т. 78, № 12. – С. 108-118.
55. Эндогенная опиоидная система как звено срочной и долговременной адаптации организма к экстремальным воздействиям. Перспективы клинического применения опиоидных пептидов / Ю. Б. Лишманов, Л. Н. Маслов, Н. В. Нарыжная и др. // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2012. – Т. 67, № 6. – С. 73-82.
56. A new mechanism of allostery in a G protein-coupled receptor dimer / J. R. Lane, P. Donthamsetti, J. Shonberg et al. // A. Nature Chemical Biology. – 2014. –Vol. 10 (9). – P.745–752.
57. A potent and selective endogenous agonist for the m-opiate receptor / J. E. Zadina, L. Hackler, L. J. Geet et al. // Nature (Lond). – 1997. – Vol.386. – P.499–502.
58. Alterations of the preproenkephalin system in cardiac hypertrophy and its role in atrioventricular conduction / J. Weil, O. Zolk, J. Griepentrog et al. // Cardiovasc. Res. – 2006. –Vol. 69 (2). – P.412–422.
59. An HPLC/RIA method for dynorphin A1–13 and its main metabolites in human blood / S. Müller, B. Ho et al. // J Pharm Biomed Anal. – 1997. – Vol.16 (1). – P.101–9.
60. Analysis of receptor oligomerization by FRAP microscopy / S. Dorsch, K.N. Klotz et al. // Nature Methods. – 2009. – Vol. 6, № 3. – P. 225–230.

61. Ananthan, S. Opioid ligands with mixed mu/delta opioid receptor interactions: an emerging approach to novel analgesics / S. Ananthan // *AAPS J.* – 2006. – Vol.8 (1). – P. 118–125.
62. Angelopoulos, T. J. Beta-endorphin immunoreactivity during high-intensity exercise with and without opiate blockade / T. J Angelopoulos // *European Journal of Applied Physiology.* – 2001. – Vol.86. – P.92-96.
63. Antagonism of LPS and IFN-gamma induction of iNOS in human saphenous vein endothelium by morphine and anandamide by nitric oxide inhibition of adenylate cyclase / G. B. Stefano, M. Salzet et al. // *J Cardiovasc Pharmacol.* – 1998. – № Vol.31 (6). – P.813-20.
64. Antiarrhythmic effect of δ -opioid receptor agonists during ischemia and reperfusion of hearts in vivo: role of KATP channels / L. N. Maslov, A. V. Krylatov, Yu. B. Lishmanov et al. // In: 3rd European Opioid Conference. Guilford. – 2000. – Abstract M28.
65. Antiarrhythmic effect of μ -opioid receptor agonist DALDA during coronary artery occlusion and reperfusion: role of KATP channels / Yu. B. Lishmanov, L. N. Maslov, A.V. Krylatov et al. // In: 3rd European Opioid Conference. Guilford. – 2000. – Abstract M27.
66. Assessment of the kappa opioid agonist, salvinorin A, as a punisher of drug self-administration in monkeys / K.B. Freeman, J.E. Naylor et al. // *Psychopharmacology (Berl).* – 2014. – Vol. 231 (14). – P.2751-2758.
67. ATP inhibits pump activity of lymph vessels via adenosine A1 receptor-mediated involvement of NO- and ATP-sensitive K⁺ channels / A. Kousai, R. Mizuno et al. // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2004. – Vol.287 (6). – H.2585-97.
68. Aukland, K. Interstitial-lymphatic mechanisms in the control of extracellular fluid volume / K. Aukland, R.K. Reed // *Physiol Rev.* – 1993. – Vol.73 (1). – P.1-78.
69. Azzali, G. Ultrastructural and three-dimensional aspects of the lymphatic vessels of the absorbing peripheral lymphatic apparatus in Peyer's patches of the rabbit / G. Azzali, M.L. Arcari // *Anat Rec.* – 2000. – Vol. 258 (1) – P.71–79.
70. Barron, B.A. Opioid peptides and the heart / B. A. Barron // *Cardiovasc Res.* – 1999. – Vol. 43. – P.13–16.
71. Barry, U. Opioids: old drugs for potential new applications / U. Barry, Z. Zuo // *Curr Pharm Des.* – 2005. – Vol.11 (10). – P.1343–1350.
72. Beadles-Bohling, A.S. Alteration of kappa-opioid receptor system expression in distinct brain regions of a genetic model of enhanced ethanol withdrawal severity / A. S. Beadles-Bohling, K.M. Wiren // *Brain Res.* – 2005. – Vol. 1046 (1–2). – P.77–89.
73. Biased agonism of clinically approved μ -opioid receptor agonists and TRV130 is not controlled by binding and signaling kinetics / M.F. Pedersen, T.M. Wróbel, E. Märcher-Rørsted et al. // *Neuropharmacology.* – 2020. – Vol.166. – P.107718.

74. Biased Agonism of Endogenous Opioid Peptides at the μ -Opioid Receptor / G. L. Thompson, J. R. Lane et al // *Mol Pharmacol.* – 2015. – Vol.88 (2). – P.335-46.
75. Biased signaling by endogenous opioid peptides / I. Gomes, S. Sierra et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2020. – Vol.117 (21). – P.11820-11828.
76. Bruchas, M.R. Kinase cascades and ligand-directed signaling at the kappa opioid receptor / M. R. Bruchas, C. Chavkin // *Psychopharmacology (Berl).* – 2010. – Vol.210 (2). – P.137-47.
77. Ca (2+)-activated Cl(-) current in sheep lymphatic smooth muscle // H. M. Toland, K. D. McCloskey et al // *Am J Phys Cell Physiol.* – 2000. – Vol. 279 (5). – C.1327–35.
78. Cadet, P. Human vascular and cardiac endothelia express mu opiate receptor transcripts / P. Cadet, T. V. Bilfinger, C. Fimiani // *Endothelium.* 2000. – Vol. 7. – P.185–191.
79. Cardiac μ -opioid receptor contributes to opioid-induced cardioprotection in chronic heart failure / S. F. He, S. Y. Jin Br et al. // *J Anaesth.* – 2018. – Vol. 121 (1). – P.26-37.
80. Catterall, W.A. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structurefunction relationships of voltage-gated calcium channels / W. A. Catterall, E. Perez-Reyes, T. P. Snutch // *Striessnig J Pharmacol.* – 2005. – Rev 57. – P.411-425.
81. CCR7 and IRF4-dependent dendritic cells regulate lymphatic collecting vessel permeability / S. Ivanov, J.P. Scallan, K.W. Kim et al. // *J Clin Invest.* – 2016. – Vol.126. – P.1581-1591.
82. Champion, H.C. D-[Ala²] endomorphin 2 and endomorphin 2 have nitric oxide-dependent vasodilator activity in rats / H.C. Champion, P.J. Kadowitz // *Am. J. Physiol.* – 1998. – Vol. 274 (5). – P.1690-1697.
83. Characteristics and kinetics of pro-opiomelanocortin mRNA expression by human leukocytes / A. Stefanou, P. Fitzharris, R.A. Knight et al. // *Brain Behav. Immun.* – 1991. – Vol. 5. – P. 319–327.
84. Characterization of biosynthesis and modes of action of prostaglandin E₂ and prostacyclin in guinea pig mesenteric lymphatic vessels / S. Rehal, P. Blanckaert et al. // *Br J Pharmacol.* – 2009. – Vol.158 (8). – P.1961-70.
85. Characterization of intact mesenteric lymphatic pump and its responsiveness to acute edemagenic stress / J.N. Benoit, D.C. Zawieja et al. // *J.Am J Physiol.* – 1989. – Vol.257. – P.2059-2069.
86. Chaudhry, S. R. Biochemistry, Endorphin [Internet] / S. R. Chaudhry, W. Gossman // Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. – Jan 2023. – Access mode: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470306/>

87. Chavkin, C. Dynorphin--still an extraordinarily potent opioid peptide / Chavkin C. // *Mol Pharmacol.* – 2013. – Vol. 83 (4). – P.729-36.
88. Chavkin, C. Specific receptor for the opioid peptide dynorphin: structure-activity relationships / C. Chavkin, A. Goldstein // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1981. – Vol. 78 (10). – P.6543-4.
89. Chemokine receptor CCR7 required for T lymphocyte exit from peripheral tissues / G.F. Debes, C.N. Arnold et al. // *Nat Immunol.* – 2005. – Vol. 6. – P.889–894.
90. Cissom, C. Dynorphins in Development and Disease: Implications for Cardiovascular Disease / C. Cissom, J. J. Paris, Z. Shariat-Madar // *Curr Mol Med.* – 2020. – Vol. 20 (4). – P.259-274.
91. Clement, C.C. The lymph as a pool of self-antigens. / C.C. Clement, O. Rotzschke, L. Santambrogio // *Trends Immunol.* – 2011. – Vol. 32. – P.6–11.
92. Clement, C.C. The lymph self-antigen repertoire / C. C. Clement, L. Santambrogio // *Front Immunol.* – 2013. – Vol. 4. – P.424.
93. Consensus statement on the immunohistochemical detection of ocular lymphatic vessels / F. Schroedl, A. Kaser-Eichberger, S. L. Schlereth et al. // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2014. – Vol. 55. – P.6440–6442.
94. Contribution and interaction of kinin receptors and dynorphin A in a model of trigeminal neuropathic pain in mice / A. P. Luiz, S.D. Schroeder et al. // *Neuroscience.* – 2015. – Vol. 300. – P.189–200.
95. Cox, B. M. Opioid activity of a peptide, beta-lipotropin-(61-91), derived from beta-lipotropin / B. M. Cox, A. Goldstein, C.H. Hi // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1976. – Vol.6. – P.1821-1823.
96. CP-96,345 antagonism of NK1 receptors and smoke-induced protein extravasation in relation to its cardiovascular effects / P. Delay-Goyet, A. Franco-Cereceda et al. // *Eur J Pharmacol.* – 1992. – Vol.10, №222. – P.213-218.
97. Crosstalk between the circadian clock circuitry and the immune system / N. Cermakian, T. Lange, D. Golombek et al. // *Chronobiology International.* – 2013. – Vol. 30, № 7 – P. 870–888.
98. Cross-talk of opioid peptide receptor and beta-adrenergic receptor signalling in the heart / S. Pepe, O. W. van den Brink et al. // *Cardiovasc Res.* – 2004. – Vol. 63 (3). – P.414-22.
99. Current research on opioid receptor function / Y. Feng, X. He et al. // *Drug Targets.* – 2012. – Vol. 13 (2). – P.230-46.
100. Czaplá, M.A. Reduced suppression of CO₂-induced ventilatory stimulation by endomorphins relative to morphine // M. A. Czaplá, J.E. Zadina // *Brain Res.* –2005. – Vol. 1059. – P.159-166.

101. Delta-opioid receptor mRNA expression and immunohistochemical localization in porcine ileum / D. R. Brown, S. Poonyachoti // *Dig. Dis. Sci.* – 1998. – Vol. 43. – P.1402–1410.
102. Desipramine reduces stress-activated dynorphin expression and CREB phosphorylation in NAc tissue / E. H. Chartoff, M. Papadopoulou, M.L. MacDonald et al. // *Jr Mol Pharmacol.* – 2009. – Vol. 75 (3). – P.704-712.
103. Differential effects of opioid agonists on G protein expression in CHO cells expressing cloned human opioid receptors / H. Xu, X. Wang, J.S. Partill et al. // *Brain Research Bulletin.* – 2008. – Vol. 77. – P. 49–54.
104. Dimerization of the class A G protein-coupled neurotensin receptor NTS1 alters G protein interaction / J. F. White, J. Grodnitzky et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2007. – Vol.104. – P.2199–2204.
105. Dumont, M. Interactions of dynorphin A and related peptides with cardiac ouabain binding sites / M. Dumont, S. Lemaire // *J Mol Cell Cardiol.* – 1996. – Vol.28 (3). – P.615–21.
106. Dumont, M. Opioid and nonopioid cardiovascular effects of dynorphins / M. Dumont, S. Lemaire // *Adv Pharmacol.* – 1997. – Vol.37. – P.1-33.
107. Dynorphin A 1–13 stimulates ovine fetal pituitary-adrenal function through a novel nonopioid mechanism / C. C. Taylor, D. Wu et al. // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* – 1997. – Vol.280. – P.416–421.
108. Dynorphin A activates bradykinin receptors to maintain neuropathic pain / J. Lai, M.C. Luo, Q. Chen et al. // *Nat Neurosci.* – 2006. – Vol. 9 (12). – P.1534-40.
109. Dynorphin A elicits an increase in intracellular calcium in cultured neurons via a non-opioid, non-NMDA mechanism / Q. Tang, R. M. Lynch et al // *Journal of Neurophysiology.* – 2000. – Vol.83. – P. 2610–2615.
110. Dynorphin B is an agonist of nuclear opioid receptors coupling nuclear protein kinase C activation to the transcription of cardiogenic genes in GTR1 embryonic stem cells / C. Ventura, E. Zinellu et al. // *Circ. Res.* – 2003. – Vol. 92. – P.623–629.
111. Dynorphin-(1–13), an extraordinarily potent opioid peptide / A. Goldstein, S. Tachibana et al. // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1979. – Vol.76 (12). – P.6666–6670.
112. Eddinger, T. J. Myosin heavy chain isoforms and dynamic contractile properties: skeletal versus smooth muscle / T. J. Eddinger // *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* – 1998. – Vol.119. – P.425-434.
113. Edwards, G. Endothelium-derived hyperpolarising factors and associated pathways: a synopsis / G. Edwards, M. Féletou, A.H. Weston // *Pflugers Arch.* – 2010. – Vol.459 (6). – P.863-879.
114. Effect of indomethacin on opioid-induced gastric protection in cold-restrained stress / G. M. Scoto, C. Parenti, E. Scoto et al. // *Life Sci.* – 1991. – Vol.48 (9). – P.867-871.

115. Electrophysiological properties of rat mesenteric lymphatic vessels and their regulation by stretch / P.Y. von der Weid, S. Lee et al. // *Lymphat Res Biol.* – 2014. – Vol.12 (2). – P.66-75.
116. Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors / J. A. Lord, A. A. Waterfield et al. // *Nature.* – 1977. – Vol.267 (5611). – P.495-9.
117. Endomorphin 1 and 2, endogenous ligands for the mu-opioid receptor decrease cardiac output, and total peripheral resistance in the rat / H.C. Champion, J.E. Zadina et al. // *Peptides.* – 1997. – Vol.18. – P.1393-1397.
118. Endomorphin 1 and 2, the endogenous mu-opioid agonists, produce biphasic changes in systemic arterial pressure in the cat / H.C. Champion, T.J. Bivalacqua et al. // *Life Sci.* – 1998. – Vol.63. – P.131-136.
119. Endomorphin-2 is released from newborn rat primary sensory neurons in a frequency- and calcium-dependent manner / H. L. Scanlin, E. A. Carroll et al. // *Eur J Neurosci.* – 2008. – Vol.27. – P.2629-2642.
120. Endomorphins interact with tachykinin receptors / P. Kosson, I. Bonney et al. // *Peptides.* – 2005. – Vol.26. – P.1667–1669.
121. Evidence for MOR on cell membrane, sarcoplasmic reticulum and mitochondria in left ventricular myocardium in rats / S. Treskatsch, M. Shaqura et al. // *Heart Vessels.* – 2016. – Vol.31 (8). – P.1380-8.
122. Evidence that a significant number of naive T cells enter non-lymphoid organs as part of a normal migratory pathway // S. Cose, C. Brammer et al. // *Eur J Immunol.* – 2006. – Vol. 36. – P.1423–1433.
123. Evidence that the ATP-induced increase in vasomotion of guinea-pig mesenteric lymphatics involves an endothelium-dependent release of thromboxane A2 / J. Gao, J. Zhao et al. // *Br J Pharmacol.* – 1999. – Vol.127 (7). – P.1597-1602.
124. Exploiting lymphatic vessels for immunomodulation: Rationale, opportunities, and challenges / K. Maisel, M.S. Sasso et al. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2017. – Vol.114. – P.43–59.
125. Expression of delta- and mu-opioid receptors in the ventricular and subventricular zones of the developing human neocortex / A. Tripathi, N. Khurshid et al. // *Neurosci. Res.* – 2008. – Vol.61. – P.257–270.
126. Expression of functional δ opioid receptors in vascular smooth muscle / R. W. Saeed, G. B. Stefano, J.D. Murga et al. // *Int J Mol Med.* – 2000. – Vol.6 (6). – P.673-677.
127. Ferguson, M.K. Nitric oxide and endothelium-dependent relaxation in tracheobronchial lymph vessels / M. K. Ferguson, V. J. DeFilippi // *Microvasc Res.* –1994. – Vol.47 (3). – P.308-317.

128. Functional couplings of the delta- and the kappa-opioid receptors with the G-protein-activated K⁺ channel / K. Ikeda, T. Kobayashi et al. // *Biochem Biophys Res Commun.* – 1995. – Vol. 208 (1). – P.302-8.
129. Functionally specialized junctions between endothelial cells of lymphatic vessels / P. Baluk, J. Fuxe, H. Hashizume et al. // *J Exp Med.* –2007. – Vol. 204 (10). – P.2349–2362.
130. Gashev, A. A. Comparison of the active lymph pumps of the rat thoracic duct and mesenteric lymphatics / A. A. Gashev, D. C. Zawieja // Presented at the 7th World Congress for Microcirculation, Sidney, Australian and New Zealand Microcirculation Society. — 2001. — P. 1–19.
131. Gashev, A. A. Physiologic aspects of lymphatic contractile function: current perspectives / A.A. Gashev // *Ann N Y Acad Sci.* – 2002. – Vol. 979. – P.178-187.
132. Gashev, A.A. Inhibition of the active lymph pump by flow in rat mesenteric lymphatics and thoracic duct / A.A. Gashev, M.J. Davis, D.C. Zawieja // *J Physiol.* – 2002. – Vol.540. – P.1023-1037.
133. Gasheva, O.Y. Contraction-initiated NO-dependent lymphatic relaxation: a self-regulatory mechanism in rat thoracic duct / O.Y. Gasheva, D.C. Zawieja, A. A. Gashev // *J Physiol.* – 2006. – Vol.575 (3). – P.821-832.
134. Gastrointestinal lymph and lymphatics / J.A. Barrowman, P. Tso et al. // In: Johnston M, editor. *Experimental biology of the lymphatic circulation.* Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1985. – p.427.
135. Gender effect on beta-endorphin response to exercise / A. H. Goldfarb, A. Z. Jamurtas et al. // *Medicine and Science in Sports and Exercise.* – 1998. – Vol. 30 (12). – P.1672-1676.
136. Giri, A.K. Investigational peptide and peptidomimetic μ and δ opioid receptor agonists in the relief of pain / A. K. Giri, V. J. Hruba // *Expert. Opin. Investig. Drugs.* – 2014. – Vol.23. – P.227–241.
137. Goldfarb, A.H. Beta-endorphin response to exercise: An update / A. H. Goldfarb, A. Z. Jamurtas // *Sports Medicine* – 1997. – Vol. 24 (1). – P.8-16.
138. Goldstein, A. Binding selectivity profiles for ligands of multiple receptor types: focus on opioid receptors / A. Goldstein // *Trends Pharmacol Sci.* – 1987. – Vol. 8. – P.456-459.
139. G-protein-coupled receptor signaling components localize in both sarcolemmal and intracellular caveolin-3-associated microdomains in adult cardiac myocytes / B.P. Head, H.H. Patel, D.M. Roth et al. // *J. Biol. Chem.* – 2005. – Vol. 280 (35). – P.31036-31044.
140. Hartwig, A.C. Peripheral Beta Endorphin and Pain Modulation / A.C. Hartwig // *Anesth Prog.* – 1991. – Vol. 38. – P.75-78.
141. Hazum, E. Specific nonopioid receptors for β -endorphin / E. Hazum, K.-J. Chang, P. Cuatrecasas // *Science.* – 1979. – Vol. 205. – P.1033-1035.

142. Headrick, J.P. Non-Analgesic Effects of Opioids: Cardiovascular Effects of Opioids and their Receptor Systems / J.P. Headrick, S. Pepe, J.N. Peart // *Current Pharmaceutical Design*. – 2012. – Vol. 18. – P. 6090-6100.
143. Heredity and pituitary response to exercise-related stress in trained men / L. Di Luigi, L. Guidetti et al. // *International Journal of Sports Medicine*. – 2003. – Vol. 24. – P.551-558.
144. Heterodimerization and cross-desensitization between the μ -opioid receptor and the chemokine CCR5 receptor / C. Chen, J. Li, G. Bot et al. // *Eur. J. Pharmacol.* – 2004. – Vol. 483. – P. 175–186.
145. Hewavitharana, T. Non-canonical signaling and localizations of heterotrimeric G proteins / T. Hewavitharana, P. B. Wedegaertner // *Cellular Signalling*. – 2012. – Vol. 24 (1). – P.25-34.
146. Holzer, P. Opioid receptors in the gastrointestinal tract / P. Holzer // *Regul Pept.* – 2009. – Vol. 155 (1-3). – P.11-7.
147. Horstmann, E. Über die funktionelle Struktur der mesenterialen Lymphgefäße / E. Horstmann // *Morphol. Jahrb.* – 1951. – Bd. 91, № 4. – P.483–510.
148. Horvath, G. Endomorphin-1 and endomorphin-2: pharmacology of the selective endogenous μ -opioid receptor agonists / G. Horvath // *Pharmacol Ther.* – 2000. – Vol. 88. – P.437-463.
149. Hugues, G.A. The effect of $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ cotransport inhibition and chloride channel blockers on membrane potential and contractility in rat lymphatic smooth muscle in vitro / G.A. Hugues, A.A. Harper // *J Physiol.* – 1999. – Vol. 518. – P.127.
150. Human lymphatic vessel contractile activity is inhibited in vitro but not in vivo by the calcium channel blocker nifedipine / N. Telinius, S. Mohanakumar, J. Majgaard et al // *J Physiol.* – 2014. – Vol. 592. – P.4697-4714.
151. Human neural precursor cells express functional kappa-opioid receptors / W.S. Sheng, S. Hu et al. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2007. – Vol. 322. – P.957-963.
152. Identification of a fourth opioid core sequence in a prodynorphin cDNA cloned from the brain of the amphibian, *Bufo marinus*: deciphering the evolution of prodynorphin and proenkephalin / P. Danielson, D. Walker et al. // *Neuroendocrinology*. – 2002. – Vol. 76 (1). – P.55-62.
153. Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity / J. Hughes, T.W. Smith, H.W. Kolsterlitz et al. // *Nature*. – 1975. – Vol. 258 – P. 577–579.
154. Immobilization Stress Inhibits Intimal Fibromuscular Proliferation in the Process of Arterial Remodeling in Rats / K. Iwai, T. Takahashi, T. Nakahashi et al. // *Hypertension Research*. – 2008. – Vol. 31. – P. 977-986.

155. Independent and interactive effects of preload and afterload on the pump function of the isolated lymphangion / J. P. Scallan, J. H. Wolpers, M. Muthuchamy et al. // *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. – 2012. – Vol. 303 (7). – H.809-24.
156. Integration and Spatial Organization of Signaling by G Protein-Coupled Receptor Homo- and Heterodimers / R. Maggio, I. Fasciani et al. // *Biomolecules*. – 2021. – Vol.11 (12). – P.1828.
157. Intrinsic increase in lymphangion muscle contractility in response to elevated afterload / M.J. Davis, J. P. Scallan et al. // *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. – 2012. – Vol.303. – P.795-808.
158. Intrinsic pump-conduit behavior of lymphangions / C. M. Quick, A. M. Venugopal, A. A. Gashev, D. C. Zawieja, R. H. Stewart // *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. – 2007. – Vol. 292(4). – R. 1510-8.
159. Isolation of Relatively Large Amounts of Endomorphin-1 and Endomorphin-2 From Human Brain Cortex / L. Hackler, J.E. Zadina et al. // *Peptides*. – 1997. – Vol.18 (10). – P.1635-1639.
160. Jaffe J.H., Martin W.R. Opioid analgesics and antagonists. In: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Eds: A.G. Gilman, T.W. Rall, A.S. Nies / New York: Pergamon Press., 1990. – P.485-521.
161. Jaimes, E.A. Effects of the reactive oxygen species hydrogen peroxide and hypochlorite on endothelial nitric oxide production / E.A. Jaimes, C. Sweeney, L. Raij // *Hypertension*. – 2001. – Vol.38. – P.877–883.
162. Johnson, L. A. In *Sickness and in Health: The Immunological Roles of the Lymphatic System* / L.A. Johnson // *Int J Mol Sci*. – 2021. – Vol. 22 (9). – P.4458.
163. Jordan, B. A. G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function / B. A. Jordan, L. A. Devi // *Nature*. – 1999. – Vol. 399 (6737). – P.697-700.
164. Jordan, B. A. Molecular mechanisms of opioid receptor signal transduction / B. A. Jordan, L. A. Devi // *Br J Anaesth*. – 1998. – Vol. 81 (1). – P.12-19.
165. Kampmeier, O.F. The genetic history of the valves in the lymphatic system of man / O. F. Kampmeier // *American Journal of Anatomy*. – 1928. – Vol. 40. – P.413–57.
166. Kappa-opioid receptor activation modulates Ca²⁺ currents and secretion in isolated neuroendocrine nerve terminals / K. I. Rusin, D.R. Giovannucci et al. // *J Neurosci*. – 1997. – Vol. 17 (17). – P. 6565-74.
167. Kenakin, T. Functional selectivity and biased receptor signaling / T. Kenakin // *J Pharmacol Exp Ther*. – 2011. – Vol. 336 (2). – P.296-302.
168. Lee, S. Distinct roles of L- and T-type voltage-dependent Ca²⁺ channels in regulation of lymphatic vessel contractile activity / S. Lee, S. Roizes, P.Y. von der Weid // *J Physiol*. – 2014. – Vol.592. – P.5409-5427.

169. Lithium attenuates the effects of dynorphin A (1-13) on inositol 1,4,5-trisphosphate and intracellular Ca²⁺ in rat ventricular myocytes / J.Z. Sheng, N. S. Wong et al. // *Life Sci.* – 1996. – Vol. 59 (25-26). – P.2181-6.
170. Localization of endomorphin-2-like immunoreactivity in the rat medulla and spinal cord // S. Martin-Schild, J. E. Zadina et al. // *Peptides.* – 1997. – Vol.18. – P.1641–1649.
171. Logan, R.W. Circadian nature of immune function / R.W. Logan, D.K. Sarkar // *Mol. Cell Endocrinology.* – 2012. – Vol. 349 – P. 82-90.
172. Lymph flow in instrumented dogs varies with exercise intensity / P. Desai, A. G. Jr Williams et al // *Lymphat Res Biol.* – 2010. – Vol. 8(3). – P.143-8.
173. Lymph formation, composition and circulation: a proteomics perspective / K.C. Hansen, A. D'Alessandro et al. // *Int Immunol.* – 2015. – Vol. 27. – P.219–227.
174. Lymphatic muscle cells in rat mesenteric lymphatic vessels of various ages / E.A. Bridenbaugh, I.T. Nizamutdinova et al. // *Lymphat Res Biol.* – 2013. – Vol.11 (1). – P.35-42.
175. Lymphatic pumping: mechanics, mechanisms and malfunction / J. P. Scallan, S. D. Zawieja et al. // *J Physiol.* – 2016. – Vol. 594 (20). – P.5749-5768.
176. Lymphatic Vessel Network Structure and Physiology / J.W. Breslin, Y. Yang et al. // *Compr Physiol.* – 2018. – Vol.9 (1). – P.207-299.
177. Maggio, R. G protein-coupled receptor oligomerization provides the framework for signal discrimination / R. Maggio, G. Innamorati, M. Parenti // *J. Neurochem.* – 2007. – Vol.103. – P.1741–1752.
178. Maslov, L. N. Changes in opioid peptide level in the heart and blood plasma during acute myocardial ischaemia complicated by ventricular fibrillation / L. N. Maslov, Y. B. Lishmanov // *Clin. Exp. Pharm. Physiol.* – 1995. – Vol.22. – P.812–816.
179. McDonald, J. Opioid receptors Continuing Education in Anaesthesia / J. McDonald, D.G. Lambert // *Critical Care & Pain.* – 2005. – Vol.5. – P.22-25.
180. McHale, N.G. The effects of catecholamines on pumping activity in isolated bovine mesenteric lymphatics / N.G. McHale, I.C. Roddie // *J Physiol.* – 1983. – Vol.338. – P.527-36.
181. Methionine-enkephalin-and Dynorphin A-release from immune cells and control of inflammatory pain / P. J. Cabot, L. Carter et al. // *Pain.* – 2001. – Vol.93 (3). – P.207-212.
182. Meyer, T. Exercise and Endogenous Opiates. From: Contemporary Endocrinology: Sports Endocrinology / T. Meyer, L. Schwarz, W. Kindermann // Edited by: M. P. Warren and N. W. Constantini. Totowa, N.J.: Humana Press., 2000. – P.31-42.
183. Milligan, G. GPCR homo-oligomerization / G. Milligan, R. J. Ward, S. Marsango // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 2019. – Vol.57. – P.40–47.

184. Milligán, G. Methods to monitor the quaternary structure of G protein-coupled receptors / G. Milligán, M. Bouvier // *FEBS J.* – 2005. – Vol. 272. – P. 2914-2925.
185. Minami, M. Molecular biology of the opioid receptors: Structures functions and distributions / M. Minami // *Neurosci Res.* – 1995. – Vol. 23. – P.121-145.
186. Mislin, H. Experimenteller Nachweis der autochtonrn Automatic der Lymphgefasse / H. Mislin // *Experientia.* – 1961. – Vol. 17. – P. 19–30.
187. Mislin, H. The Lymphangion. *Lymphangiology* / H. Mislin. Stuttgart. New York: Schaffauerverlag, 1983. – P.165-175
188. Mitochondrial K (ATP) channels: role in cardioprotection / O. Oldenburg, M. V. Cohen et al. // *Cardiovasc. Res.* – 2002. – Vol. 55 (3). – P.429-437.
189. Modulation of lymphatic muscle contractility by the neuropeptide substance / M. J. Davis, M. M. Lane et al. // *P. Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2008. – Vol. 295. – P.587–597.
190. Modulation of Opioid Actions by Nitric Oxide Signaling / N. Toda, S. Kishioka et al. // *Anesthesiology.* – 2009. – Vol.110 (1). – P.166-81.
191. Mogil, J.S. The molecular and behavioral pharmacology of the orphanin FQ/nociceptin peptide and receptor family / J.S. Mogil, G.W. Pasternak // *Pharmacol Rev.* – 2001. – Vol.53 (3). – P.381-415.
192. Molecular and functional analyses of the contractile apparatus in lymphatic muscle / M. Muthuchamy, A. Gashev et al // *FASEB J.* – 2003. – Vol.17 (8). – P. 920-2.
193. Mu and kappa opioids modulate mouse embryonic stem cell-derived neural progenitor differentiation via MAP kinases / J. W. Hahn, S. Jagwani et al. // *J. Neurochem.* – 2010. – Vol.112. – P.1431–1441.
194. Mullick, M. The Delta Opioid Peptide DADLE Represses Hypoxia-Reperfusion Mimicked Stress Mediated Apoptotic Cell Death in Human Mesenchymal Stem Cells in Part by Downregulating the Unfolded Protein Response and ROS along with Enhanced Anti-Inflammatory Effect / M. Mullick, D. Sen // *Stem. Cell Rev. Rep.* – 2018. – Vol.4. – P.558–573.
195. Multichromatic near-infrared imaging to assess interstitial lymphatic and venous uptake in vivo / F. C. Bernard, J. Kaiser et al. // *J Biomed Opt.* – 2021. – Vol.26 (12). – P.126001.
196. Myogenic constriction and dilation of isolated lymphatic vessels / M. J. Davis, A. M. Davis et al. // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2009. – Vol.296 (2). – P.293-302.
197. Neurochemical features of endomorphin-2-containing neurons in the submucosal plexus of the rat colon / J.P. Li, T. Zhang, C.J. Gao et al. // *World J Gastroenterol.* – 2015. – Vol.21. – P.9936-9944.

198. New insights into the intracellular mechanisms by which PGI₂ analogues elicit vascular relaxation: cyclic AMP-independent, G_s-protein mediated-activation of MaxiK channel / Y. Tanaka, F. Yamaki et al. // *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents*. – 2004. – Vol.2 (3). – P.257-65.
199. Ng, S.Y. Receptor oligomerization: from early evidence to current understanding in class B GPCRs / S.Y. Ng, L.T. Lee, B.K. Chow // *Frontiers in Endocrinology*. – 2013. – Vol.4 (3). – P.175.
200. Noninvasive delayed limb ischemic preconditioning attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury in rats by a mitochondrial K(ATP) channel-dependent mechanism / Y.N. Wu, H. Yu et al. // *Physiol Res*. – 2011. – Vol. 60 (2). – P.271-9.
201. Nonopioid effects of dynorphin and des-tyr-dynorphin / J. M. Walker, H. C. Moises et al // *Science*. – 1982. – Vol. 218. – P.1136–1139.
202. Novel opioid peptides endomorphin-1 and endomorphin-2 are present in mammalian immune tissues / D.S. Jessop, G.N. Major et al. // *J Neuroimmunol*. – 2000. – Vol. 106. – P.53–59.
203. Nuclear opioid receptors activate opioid peptide gene transcription in isolated myocardial nuclei / C. Ventura, M. Maioli, G. Pintus et al. // *J Biol Chem*. – 1998. – Vol. 273 (22). – P.13383-6.
204. Ohhashi, T. Acetylcholine-induced release of endothelium-derived relaxing factor from lymphatic endothelial cells / T. Ohhashi, N. Takahashi // *Am J Physiol*. –1991. – Vol. 260 (4 Pt 2). – H.1172-8.
205. Ohhashi, T. Effect of potassium on membrane potential and tension development in bovine mesenteric lymphatics / *Microvasc Res*. // T. Ohhashi, T. Azuma. – 1982. – Vol. 23 (1). – P.93–8.
206. Ohhashi, T. Vasa vasorum within the media of bovine mesenteric lymphatics / T. Ohhashi, S. Fukushima, T. Azuma // *Proc Soc Exp Biol Med*. – 1977. – Vol. 154 (4). – P.582-6.
207. Oligomerization of μ - and δ -opioid receptors. Generation of novel functional properties / S.R. George, T. Fan et al. // *J Biol Chem*. – 2000. – Vol. 275. – pp. 26128-26135.
208. Opioid peptides endomorphin-1 and endomorphin-2 in the immune system in humans and in a rodent model of inflammation / D. S. Jessop, L. J. Richards et al. // *Acad Sci*. – 2002. – Vol. 966. – P.456-463.
209. Opioid receptor agonists activate pertussis toxin-sensitive G proteins and inhibit adenylyl cyclase in canine cardiac sarcolemma / F. Niroomand, R.A. Mura et al. // *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. – 1996. – Vol. 354(5). – P. 643-9.
210. Opioid receptors and cardioprotection –‘opioidergic conditioning’ of the heart / J.P. Headrick, L.E. See Hoe et al. // *Br J Pharmacol*. – 2015. – Vol. 172 (8). – P. 2026-50.

211. Opioid receptors in rat cardiac sarcolemma: effect of phenylephrine and isoproterenol / C. Ventura, L. Bastagli, P. Bernardi et al. // *Biochim Biophys Acta*. – 1989. – Vol. 987 (1). – P.69-74.
212. Passive pressure-diameter relationship and structural composition of rat mesenteric lymphangions / E. Rahbar, J. Weimer, H. Gibbs et al. // *Lymphat Res Biol*. – 2012. – Vol. 10 (4). – P.152-163.
213. Pattinson, K.T. Opioids and the control of respiration / K.T. Pattinson // *Br J Anaesth*. – 2008. – Vol.100. – P.747–58.
214. Perivascular expression and potent vasoconstrictor effect of dynorphin A in cerebral arteries / É. Ruisanchez, A. Cselenyák et al. // *PLoS One*. – 2012. – Vol.7 (5). – e37798.
215. Pfitzer, G. Invited review: regulation of myosin phosphorylation in smooth muscle / G. Pfitzer // *J Appl Physiol* (1985). – 2001. – Vol. 91(1). – P.497-503.
216. Pflieger, K. D. Illuminating insights into proteinprotein interactions using bioluminescence resonance energy transfer (BRET) / K. D. Pflieger, K. A. Einde // *Nat. Methods*. – 2006. – Vol. 3. – P. 165-174.
217. Physiology, signaling, and pharmacology of opioid receptors and their ligands in the gastrointestinal tract: current concepts and future perspectives / M. Sobczak, M. Sałaga et al. // *J Gastroenterol*. – 2014. – Vol. 49 (1). – P.24-45.
218. Pituitary-adrenal responses to arm versus leg exercise in untrained man / C. M. Maresh, B. Sokmen et al. // *European Journal of Applied Physiology*. – 2006. – Vol. 97. – P.471-477.
219. Plasma beta-endorphin concentration: response to intensity and duration of exercise / A. H. Goldfarb, B. D. Hatfield et al. // *Medicine and Science in Sports and Exercise*. – 1990. – Vol. 22 (2). – P.241-244.
220. Presence of the mu3 opiate receptor in endothelial cells. Coupling to nitric oxide production and vasodilation / G.B. Stefano, A. Hartman, T.V. Bilfinger et al. // *J.Biol.Chem*. – 1995. – Vol. 270 (51). – P.30290-30293.
221. Pressure-volume relationships in sheep mesenteric lymphatic vessels in situ: response to hypovolemia / B. Li, I. Silver et al. // *Microvasc Res*. – 1998. – Vol. 56 (2). – P.127–138.
222. Prodynorphin processing by proprotein convertase 2. Cleavage at single basic residues and enhanced processing in the presence of carboxypeptidase activity / R. Day, C. Lazure et al. // *J Biol Chem*. – 1998. – Vol. 273 (2). – №829-836.
223. Protein kinase C signaling transduces endorphin-primed cardiogenesis in GTR1 embryonic stem cells / C. Ventura, E. Zinellu et al // *Circ Res*. – 2003. – Vol. 92. –P.617–622.
224. Pugsley, M. K. Cardiovascular actions of the K-agonist, U-50,488H, in the absence and presence of opioid receptor blockade / M. K. Pugsley, W.P. Penz, M. J. Walker // *Br. J. Pharmacol*. – 1992. – Vol. 105 (3). – P.521-526.

225. Randich, A. The use of specific opioid agonists and antagonists to delineate the vagally mediated antinociceptive and cardiovascular effects of intravenous morphine / A. Randich, J. D. Robertson, T. Willingham // *Brain Res.* – 1993. – Vol. 603 (2). – P.186-200.
226. Razavi, M. S. Characterization of rat-tail lymphatic contractility and biomechanics: incorporating nitric oxide-mediated vasoregulation / M. S. Razavi, J. B. Dixon, R. L. Gleason // *J R Soc Interface.* – 2020. – Vol.17 (170). – P. 20200598.
227. Reddy, L.V.K. DADLE enhances viability and anti-inflammatory effect of human MSCs subjected to ‘serum free’ apoptotic condition in part via the DOR/PI3K/AKT pathway / L.V.K. Reddy, D. Sen // *Life Sci.* – 2017. – №191. – P.195–204.
228. Regional variations of contractile activity in isolated rat lymphatics / A.A. Gashev, M.J. Davis et al. // *Microcirculation.* – 2004. – Vol.11. – P.477-492.
229. Sadjja, R. Gating of GIRK channels: details of an intricate, membrane-delimited signaling complex / R. Sadjja, N. Alagem, E. Reuveny // *Neuron.* – 2003. – Vol. 39 (1). – P.9-12.
230. Santambrogio, L. Carrying yourself: self-antigen composition of the lymphatic fluid / L. Santambrogio, L. J. Stern // *Lymphat Res Biol.* – 2013. – Vol. 11. –P.149–154.
231. Schäfer, M. Interleukin 1 beta and corticotropin-releasing factor inhibit pain by releasing opioids from immune cells in inflamed tissue / M. Schäfer, L. Carter, C. Stein // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1994. – Vol. 91(10). – P.4219-23.
232. Schulte-Merker, S. Lymphatic vascular morphogenesis in development, physiology, and disease / S. Schulte-Merker, A. Sabine, T. V. Petrova // *J Cell Biol.* – 2011. – Vol. 193 (4). – P.607-18.
233. Schwarz, L. Changes in β -Endorphin levels in response to aerobic and anaerobic exercise / L. Schwarz, W. Kindermann // *Sports Medicine.* – 1992. – Vol.13 (1). – P.25-36.
234. Schwarzer, C. 30 years of dynorphins-new insights on their functions in neuropsychiatric diseases / C. Schwarzer // *Pharmacol Ther.* – 2009. – Vol.123 (3). – P.353-70.
235. Seale, J. V. Immunohistochemical staining of endomorphin 1 and 2 in the immune cells of the spleen / J. V. Seale, D. S. Jessop // *Peptides.* – 2004. – Vol.25. – P.91-94.
236. Selectivity determinants of GPCR-G-protein binding / T. Flock, A.S. Hauser, N. Lund et al. // *Nature.* – 2017. – Vol.18, №545 (7654). – P.317-322.
237. Selye, H. Adaptive reactions to stress / H. Selye, C. Fortier // *Res. Publ. Assoc. Res. Nerv. Ment. Dis.* – 1949. – Vol. 29. – P.3-18.
238. Selye, H. Forty years of stress research: principal remaining problems and misconceptions / H. Selye // *Can. Med. Assoc. J.* – 1976. – Vol.155 (1). – P.53-56.
239. Selye, H. Syndrome produced by diverse nocuous agents / H. Selye // *Nature.* – 1936. – Vol. 138 (3479). – P.32.

240. Shankar, V. Opioids contribute to hypoxia-induced pial artery dilation through activation of ATP-sensitive K⁺ channels / V. Shankar, W. M. Armstread // *Am. J. Physiol.* – 1995. – Vol.269. – P.997-1002.
241. Sharp, B.M. Multiple opioid receptors on immune cells modulate Intracellular signaling / B. M. Sharp // *Brain Behav. Immun.* – 2006. – Vol. 20. – P.9-14.
242. Short term morphine exposure in vitro alters proliferation and differentiation of neural progenitor cells and promotes apoptosis via mu receptors / D. Willner, A. Cohen-Yeshurun // *PLoS ONE.* – 2014. – Vol.9. – e103043.
243. Shukla, V. K. Non-opioid effects of dynorphins: possible role of the NMDA receptor / V. K. Shukla, S. Lemaire // *Trends Pharmacol Sci.* – 1994. – Vol.11. – P.420-424.
244. Skarphedinsson, J.O. Endorphin mechanisms are responsible for the beneficial effects of opioid antagonists on cerebral function during relative cerebral ischaemia in rats // J. O. Skarphedinsson, P. Thoren // *Acta Physiologica Scandinavica.* – 1988. – Vol. 32 (3). – P.281–8.
245. Skobe, M. Structure, function, and molecular control of the skin lymphatic system / M. Skobe, M. Detmar // *J Investig Dermatol Symp Proc.* – 2000. – Vol. 5. – P.14–9.
246. Spampinato, S. Immunoreactive dynorphin in rat tissues and plasma / S. Spampinato, A. Goldstein // *Neuropeptides.* – 1983. – Vol.3 (3). – P.193-212.
247. Spontaneous electrical activity in isolated bovine lymphatics recorded by intracellular microelectrodes / S.M. Ward, K.M. Sanders et al. // *J Physiol.* – 1991. – Vol.438. – P.168.
248. Spontaneous electrical activity in sheep mesenteric lymphatics / E.A. Beckett, M.A. Hollywood et al. // *Lymphat Res Biol.* – 2007. – Vol.5 (1). – P.29-43.
249. Spontaneous transient depolarizations in lymphatic vessels of the guinea pig mesentery: Pharmacology and implication for spontaneous contractility / P.Y. von der Weid, M. Rahman et al. // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2008. – Vol. 295. – H.1989-2000.
250. Stimulation of guanosine-5'-O-(3-[35S]thio) triphosphate binding by endogenous opioids acting at a cloned m receptor / A. Alt, A. Mansour, H. Akil, F. Medzihradsky et al. // *J Pharmacol Exp Ther.* – 1998. – Vol. 286. – P.282-288.
251. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels / A. Louveau, I. Smirnov, T.J. Keyes et al. // *Nature.* – 2015. – Vol. 523. – P.337-341.
252. Substance P activates both contractile and inflammatory pathways in lymphatics through the neurokinin receptors NK1R and NK3R / S. Chakraborty, Z. Nepiyushchikh et al. // *Microcirculation.* – 2011. – Vol.18 (1). – P.24-35.
253. Swartz, M. A. The physiology of the lymphatic system / M. A. Swartz // *Adv Drug Deliv Rev.* – 2001. – Vol. 50. – P.3-20.

254. Synthetic peptide SLTCLVKGFY competes with β -endorphin for naloxone-insensitive binding sites on rat brain membranes / E. V. Navolotskaya, T. A. Zargarova et al. // *Peptides*. – 2002. – Vol.23. – P.1115-1119.
255. Synthetic β -endorphin-like peptide immunomorphin binds to nonopioid receptors for β -endorphin on T lymphocytes / E. V. Navolotskaya, N. V. Malkova et al. // *Peptides*. – 2001. – Vol. 22. – P.2009–2013.
256. Tanaka, K. Opioid-induced cardioprotection / K. Tanaka, J. R. Kersten, M. L. // *Riess Curr. Pharm. Des.* – 2014. – Vol. 20 (36). – P.5696-5705.
257. Terenius, L. Characteristics of the "receptor" for narcotic analgesics in synaptic plasma membrane fraction from rat brain / L. Terenius // *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*. – 1973. – Vol.33 (5). – P.377-84.
258. Tetrodotoxin-sensitive sodium current in sheep lymphatic smooth muscle / M.A. Hollywood, K.D. Cotton et al. // *J Physiol*. – 1997. – Vol. 503. – P.13–20.
259. The contribution of K(+) channels to human thoracic duct contractility / N. Telinius, S. Kim, H. Pilegaard et al. // *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. – 2014. – Vol.307. – H33-H43.
260. The decline in serum choline concentration in humans during and after surgery is associated with the elevation of cortisol, adrenocorticotrophic hormone, prolactin and beta-endorphin concentrations / Y. Ozarda Ilcol, G. Ozyurt et al // *Neurosci Lett*. – 2002. – Vol. 324 (1). – P.41-4.
261. The effects of endomorphin-1 and endomorphin-2 in CHO cells expressing recombinant mu-opioid receptors and SH-SY5Y cells / C. Harrison, S. McNulty et al. // *Br J Pharmacol*. – 1999. – Vol.128. – P.472-478.
262. The effects of morphine- and nalorphine- like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog / W. R. Martin, C. G. Eades // *J Pharmacol Exp Ther*. – 1976. – Vol. 197 (3). – P.517-32.
263. The endogenous mu-opioid receptor agonist's endomorphins 1 and 2 have novel hypotensive activity in the rabbit / H.C. Champion, J.E. Zadina et al. // *Biochem Biophys Res Commun*. – 1997. – Vol. 235. – P.567-570.
264. The Lymphatic Vasculature in the 21st Century: Novel Functional Roles in Homeostasis and Disease / G. Oliver, J. Kipnis et al. // *Cell*. – 2020. – Vol.182 (2). – P.270-296.
265. The role of alpha- and beta-adrenoceptors in the response to noradrenaline of lymphatic vessels isolated from the bovine mesentery / L. Mahe, B. Chapelain et al. // *Eur J Pharmacol*. – 1989. – Vol. 167 (1). – P.31-9.
266. The κ opioid system regulates endothelial cell differentiation and pathfinding in vascular development / K. Yamamizu, S. Furuta, S. Katayama et al. // *Blood*. – 2011. – Vol.118. – P.775–785.

267. Thompson, G. L. Biological redundancy of endogenous GPCR ligands in the gut and the potential for endogenous functional selectivity / G.L. Thompson, M. Canals, D.P. Poole // *Front Pharmacol.* – 2014. – Vol. 28 (5). – P.262.
268. Troullos, E. Ibuprofen elevates immunoreactive beta-endorphin levels in humans during surgical stress / E. Troullos, K.M. Hargreaves, R.A. Dionne // *Clin Pharmacol Ther.* – 1997. – Vol. 62 (1). – P.74-81.
269. Upregulation of the kappa opioidergic system in left ventricular rat myocardium in response to volume overload: Adaptive changes of the cardiac kappa opioid system in heart failure / S. Treskatsch, M. Shaqura, L. Dehe et al. // *Pharmacol Res.* – 2015. – Vol.102. – P.33–41.
270. Van Helden, D.F. Pacemaker potentials in lymphatic smooth muscle of the guinea-pig mesentery / D.F. Van Helden // *J Physiol.* – 1993. – Vol.471. – P.465-479.
271. Vargish, T. Delta and Mu receptor agonists correlate with greater depression of cardiac function than morphine sulfate in perfused rat hearts / T. Vargish, K. C. Beamer // *Circ Shock.* – 1989. – Vol. 27 (3). – P.245-51.
272. Vasorelaxant responses to endomorphin1 [psi] and endomorphin2 [psi], analogues of endomorphins, in rat aorta rings / Y. Feng, Q. Y. Zhao et al. // *Pharmazie.* – 2005. – Vol. 60 (11). – P.851-855.
273. Veening, J.G. The effects of beta-endorphin: state change modification / J.G. Veening, H.P. Barendregt // *Fluids Barriers CNS.* – 2015. – Vol. 12. – P.3.
274. Ventura, C. Dynorphin gene expression and release in the myocardial cell / C. Ventura, C. Guarnieri, I. Vaona // *J. Biol. Chem.* – 1994. – Vol.269, №7. – P.5384-5386.
275. Ventura, C. k and d opioid receptor stimulation affects cardiac myocyte function and Ca²⁺ release from an intracellular pool in myocytes and neurons / C. Ventura, H. A. Spurgeon, E. G. Lokatta // *Circ. Res.* – 1992. – Vol.70. – P.66-81.
276. Ventura, C. Opioid peptide gene expression primes cardiogenesis in embryonal pluripotent stem cells / C. Ventura, M. Maioli // *Circ. Res.* – 2000. – Vol. 87. – P.189-194.
277. Vogt, B.A. Localization of mu and delta opioid receptors to anterior cingulate afferents and projection neurons and input/output model of mu regulation / B. A. Vogt, R. G. Wiley, E. L. Jensen // *Exp Neurol.* – 1995. – Vol.135 (2). – P.83–92.
278. Voltage-gated sodium channels contribute to action potentials and spontaneous contractility in isolated human lymphatic vessels / N. Telinius, J. Majgaard, S. Kim et al. // *J Physiol.* – 2015. – Vol. 593 (14). – P.3109-22.
279. von der Weid, P.Y. ATP-sensitive K⁺ channels in smooth muscle cells of guinea-pig mesenteric lymphatics: role in nitric oxide and beta-adrenoceptor agonist-induced hyperpolarizations / P. Y. von der Weid // *Br J Pharmacol.* – 1998. – Vol.125 (1). – P.17-22.

280. von der Weid, P.Y. Functional electrical properties of the endothelium in lymphatic vessels of the guinea-pig mesentery / P.Y. von der Weid, D. F. Van Helden // *J Physiol.* – 1997. – Vol. 504 (Pt 2). – P.439-451.
281. von der Weid, P.Y. Nitric oxide decreases pacemaker activity in lymphatic vessels of guinea pig mesentery / P.Y von der Weid, J. Zhao, D.F. van Helden // *Am J Phys.* – 2001. – Vol. 280 (6). – H.2707–16.
282. von der Weid, P.Y. Regulatory mechanisms in lymphatic vessel contraction under normal and inflammatory conditions / P.Y. von der Weid, M. Muthuchamy // *Pathophysiology.* – 2010. – Vol.17 (4). – P.263–76.
283. von der Weid, P.Y. Lymphatic Vessel Pumping / P.Y. von der Weid // *Adv Exp Med Biol.* – 2019. – Vol.1124. – P.357-377.
284. Walther, C. Minireview: Role of intracellular scaffolding proteins in the regulation of endocrine G protein-coupled receptor signaling / C. Walther, S.S. Ferguson // *Mol Endocrinol.* – 2015. – Vol. 29 (6). – P.814-30.
285. Welters, I.D. Is immunomodulation by opioid drugs of clinical relevance? / I.D. Welters // *Curr Opin Anaesthesiol.* – 2003. – Vol.16 (5). – P.509–13.
286. West, J.B. *Best and Taylor's Physiological Basis of Medical Practice* / J.B. West. – Williams & Wilkins, Baltimore: MD, USA, 1991. – 1170p.
287. Wiig, H. Interstitial fluid and lymph formation and transport: physiological regulation and roles in inflammation and cancer / H. Wiig, M.A. Swartz // *Physiol Rev.* – 2012. – Vol.92. – P.1005–1060.
288. Wollemann, M Non-opioid actions of opioid peptides / M. Wollemann, S. Benyhe // *Life Sci.* – 2004. – Vol.75 (3). – P.257-70.
289. Wood, J.D. Function of opioids in the enteric nervous system / J. D. Wood, J. J. Galligan // *Neurogastroenterol Motil.* – 2004. – Vol. 2. – P.17-28.
290. Woods, J.A. Characterization of a naloxone-insensitive β -endorphin receptor on murine peritoneal macrophages / J.A. Woods, N.A. Shahabi, B.M. Sharp // *Life Sciences.* – 1997. – Vol. 60. – P.573–586.
291. Yamamizu, K. κ Opioid receptor ligands regulate angiogenesis in development and in tumours / K. Yamamizu, Y. Hamada, M. Narita // *Br J Pharmacol.* – 2015. – Vol. 172 (2). – P.268-76.
292. Zagon, I. S. The biology of the opioid growth factor receptor (OGFr) / I. S. Zagon, M. F. Verderame, P. J. McLaughlin // *Brain Res Brain Res Rev.* – 2002. – Vol. 38 (3). – P.351-76.
293. Zawieja, D. C. *Microlymphatic Biology* / D. C. Zawieja, P. Y. von der Weid, A. A. Gashev. – *Compr Physiol.* – 2011. – Supplement 9: Handbook of Physiology, The Cardiovascular System, Microcirculation: 125-158. First published in print 2008.

294. Zawieja, D.C. Contractile physiology of lymphatics / D.C Zawieja // *Lymphat Res Biol.* – 2009. – Vol. 7 (2). – P.87-96.
295. Zhao, J. ET-1-associated vasomotion and vasospasm in lymphatic vessels of the guinea-pig mesentery / J. Zhao, D.F. van Helden // *Br J Pharmacol.* – 2003. – Vol. 140 (8). – P.1399-413.
296. Zweifach, B. W. Pressure and Flow Relations in the Lymphatic System. / B. W. Zweifach, G. W. Schmid-Schonbein // *In Experimental Biology of the Lymphatic Circulation* (Johnston, M. G. ed.). Elsevier, New York. – 1985. – Vol. 9. – P. 45-79.
297. δ_2 opioid receptor subtype on human vascular endothelium uncouples morphine stimulated nitric oxide release / G. B. Stefano, M. Salzet et al. // *Int J Cardiol.* – 1998. – Vol. 64. – S.43–S51.