

На правах рукописи

Нечайкина Ольга Валерьевна

**ДЕЙСТВИЕ ЭНДОГЕННЫХ ОПИОИДОВ НА
СОКРАТИТЕЛЬНУЮ ФУНКЦИЮ ЛИМФАТИЧЕСКИХ
СОСУДОВ**

1.5.5 – физиология человека и животных

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург – 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном унитарном предприятии «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека» Федерального медико-биологического агентства

Научный руководитель: **Петунов Сергей Гервасиевич** – кандидат медицинских наук, доцент, заведующий научно-организационным отделом, ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России, Ленинградская область

Официальные оппоненты: **Ерофеев Николай Павлович** – доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры физиологии Медицинского института, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»

Евлахов Вадим Иванович – доктор медицинских наук, доцент, заведующий лабораторией физиологии висцеральных систем им. К.М. Быкова, ФГБУН Институт экспериментальной медицины

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ

Защита состоится « ____ » _____ 2024 г. в ____ часов на заседании Диссертационного совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 24.1.137.01 при Институте физиологии им. И.П. Павлова РАН по адресу: 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 6.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт физиологии им И.П. Павлова Российской академии наук по адресу: г. Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 6 и на сайте <http://www.infran.ru/>

Автореферат разослан « ____ » _____ 2024 года

Ученый секретарь Диссертационного совета,
доктор биологических наук

Дик Ольга Евгеньевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Лимфатическая система, частью которой является сеть специализированных лимфатических сосудов, выполняет в организме ряд важных функций, таких как поддержание гомеостаза, транспорт ультрафильтрата и электролитов из интерстиция в системную циркуляцию, резорбцию липидов и олигопептидов, а также иммунную защиту. Движение лимфы в лимфатической системе создают внутренние и внешние механизмы, нередко обозначаемые термином «лимфатическая помпа» («the lymph pump») (Aukland K., 1993; Gashev A.A., 2002; Gashev A.A., Davis M.J., 2002). 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. Обладая способностью к спонтанной сократительной активности, они обеспечивают перемещение своего содержимого в соседний сегмент в циклическом режиме. Сократительная активность коллекторных ЛС играет критически важную роль не только в продвижении лимфы в центрипетальном направлении, но также 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 факторов» (Курзанов А.Н, 2011). В ряду регуляторных механизмов, обеспечивающих стрессоустойчивость организма и препятствующих переходу «эустресса» в «дистресс», значительная роль принадлежит эндогенной опиоидной системе (ЭОС). ЭОС, благодаря экспрессии опиоидных рецепторов (ОР) во многих органах и тканях организма, и полифункциональности опиоидных пептидов (ОП), относят к универсальной биорегуляторной системе. В частности, моделирование эффектов эндогенных опиоидов позволило установить их влияние на содержание стресс-гормонов в крови, многие из которых обладают вазотропной активностью (АКТГ, вазопрессин, кортизол, катехоламины), а также на выраженность соматических нарушений, вызванных действием возмущающих факторов. Установлена протекторная роль агонистов ОР в

уменьшении последствий ишемических-реперфузионных нарушений в деятельности миокарда (Maslov L.N., 2000; Lishmanov Yu. B., 2000).

Влияние отдельных представителей класса эндогенных опиоидов (энкефалинов) и их синтетических аналогов (даларгина) на сократительную активность ЛС не системно изучалось отечественными учеными в 80-90-х годах прошлого века (Зверев М.Д., 1984; Хугаева В.К., 1988, 1992). В современной литературе описаны результаты влияния синтетического ОП на лимфоток при острой тонкокишечной непроходимости и при остром отеке легких (Коваленко А.А., 2015; Султанов Д.В., 2020). Однако механизмы их действия на ЛС исследованы не были.

Степень разработанности темы. Изучению функций лимфатической системы, как и изучению регуляции сократительной активности, посвящено достаточно научных исследований (Лобов Г.И., 1985, 1988, 1993; Гашев А.А., 1990, 2000; Ferguson M.K., 1994; Петунов С.Г., 1997; Muthuchamy M., 2003; Rehal S., 2009; Zawieja D. C., 2011; Егорова А. А., 2011; P.Y. von der Weid, 2019). 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 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, продемонстрировано уменьшение очага поражения сердечной мышцы (He S.F., 2018). Изменяя уровень гормонов стресса, ЭОС выступает в качестве модулятора гормональной системы (Лишманов Ю.Б., 1994). Обнаруженные антиязерогенный и нейропротекторный эффекты опиоидов также позволяют отнести ЭОС к стресс-лимитирующим системам (Scoto G.M., 1991; Skarphedinsson J.O., 1988). 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 (Маслов Л.Н., 2010; Лишманов Ю.Б., 1994, 2012).

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, что определило цель и задачи данного исследования.

Цель исследования: Изучить сократительную функцию ЛС 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 (ОР) в брыжеечных лимфатических сосудах 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. В исследовании впервые с использованием селективных агонистов ОР получены данные, свидетельствующие о наличии ОР в структуре брыжеечных ЛС крысы.

Впервые установлено, что β -эндорфин оказывает ингибирующее влияние на сократительную активность ЛС интактных животных, опосредованное периферическими μ - и δ -ОР лимфангионов. Показано, что влияние β -эндорфина реализуется посредством активации как потенциал-зависимых, так и АТФ-чувствительных K^+ -каналов, выявлен эндотелиальный NO-зависимый механизм действия. Установлено, что β -эндорфин на ЛС тренированных животных оказывает стимулирующее влияние, этот эффект является налоксон-зависимым и реализуется через κ -ОР.

Впервые продемонстрировано, что эндоморфин-1 (ЭМ-1) оказывает стимулирующее влияние на сократительную активность ЛС. Этот эффект является налоксон-независимым и опосредуется нейрокининовыми-1 (НК-1) рецепторами. Реализация стимулирующего

эффекта ЭМ-1 на брыжеечные ЛС осуществляется при участии 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 (IP_3) рецепторов наиболее выражен.

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

Теоретическая и практическая значимость работы. Получены новые сведения о присутствии ОР в структуре брыжеечных ЛС крысы. Результаты проведенных исследований позволили раскрыть механизмы угнетающего действия β -эндорфина, а также стимулирующего эффекта ЭМ-1 и динорфина А на брыжеечные ЛС крысы. Изучена сократительная активность ЛС тренированных и нетренированных крыс. Обнаружено различие в реактивности ЛС к β -эндорфину тренированных и нетренированных животных и раскрыт механизм стимулирующего эффекта β -эндорфина 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 зарубежных и отечественных физиологов, посвященные изучению ЭОС, в частности, изучению структуры и локализации в организме ОР и многообразия функций, выполняющих ОП; а также труды лимфологов, посвященные вопросам регуляции сократительной активности ЛС и работы анатомов и патоморфологов, изучавших вопросы строения лимфатической системы.

В диссертационном исследовании использованы следующие экспериментальные методы:

- регистрация сократительной активности изолированных ЛС в изометрических условиях (*ex vivo*) с использованием многоканального проволочного миографа Multi Wire Myograph System 610M (DMT, Дания);
- моделирование стрессовой ситуации у животных путем выполнения ими продолжительного бега на тредбане (PanLab, Испания).

Для оценки полученных результатов применены 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 множественные внутриклеточные сигнальные каскады, реализующие разнонаправленный биологический эффект.

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

3. Эндоморфин-1 оказывает независящее от концентрации стимулирующее влияние на фазную активность брыжеечных ЛС крысы, которое является налоксон-независимым и связано с активацией NK-1 рецепторов. Реализация стимулирующего эффекта ЭМ-1 осуществляется за счет рекрутирования Ca^{2+} из внутриклеточных хранилищ посредством стимуляции рианодиновых и IP_3 -рецепторов.

4. 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. Бета-эндорфин разнонаправленно влияет на моторику ЛС тренированных и нетренированных животных. Стимулирующий эффект эндогенного опиоида на ЛС тренированных животных является налоксон-зависимым и реализуется посредством κ -ОР.

Степень достоверности и апробация результатов исследования. Достоверность научных положений и выводов в диссертации обеспечена применением современной методики регистрации сократительной активности изолированных сосудистых объектов, использованием большого объема фактического материала (проанализированы параметры сократительной активности 425 сегментов ЛС), его анализом, корректной статистической обработкой данных. Статистически обработано 3840 регистрируемых и расчетных показателей сократительной активности ЛС с использованием методов описательной и аналитической статистики в программе GraphPadPrism 5.04. За критический уровень значимости принимали $p=0,05$. Для описания центральной тенденции использовалось значение среднего арифметического, в качестве меры рассеяния – величина стандартного отклонения. Нормальность распределения выборки оценена 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.

Результаты исследования 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» (СПб, 2021), III Санкт-Петербургском лимфологическом форуме «Лимфология без границ – путь в 400 лет: спорные вопросы и нерешенные проблемы, достижения и открытия» (СПб, 2022), XV научно-практической конференции с международным участием «Лимфология: от фундаментальных исследований к медицинским технологиям» имени академика Ю.И. Бородина (Новосибирск, 2023).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 13 печатных научных работ: 3 из которых – в журналах, рекомендованных ВАК.

Личный вклад автора в работу осуществлялся на всех этапах работы и состоял в планировании и постановке экспериментов, статистической обработке и интерпретации результатов экспериментов.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 166 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, характеристики материалов и методов исследования, трех глав результатов исследования, заключения, выводов, списка литературы, включающего 55 источников на русском и 242 на иностранных языках. Диссертация иллюстрирована 27 таблицами и 35 рисунками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1 – обзор литературы, содержащий современные представления о строении, функциях и регуляции сократительной активности ЛС, а также современные сведения об ЭОС, ее строении и функциях, выполняемых в организме. Глава 2 включает описание объектов, материалов и методов исследования. Глава 3 посвящена определению ОР в структуре ЛС путем использования селективных агонистов ОР. В главе 4 представлены результаты исследований о влиянии эндогенных опиоидов – β -эндорфина, ЭМ-1 и динорфина А на ЛС, а также раскрытие механизмов их действия. В главе 5 представлены материалы о влиянии β -эндорфина на сократительную активность лимфангионов тренированных крыс и раскрыты механизмы его действия. В заключении представлено обсуждение результатов исследования. Далее приведены выводы, список сокращений и список литературы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Использованные животные, дизайн экспериментов. В экспериментах использовались половозрелые здоровые нелинейные белые крысы-самцы возрастом 6 месяцев, массой 250-300 г, в количестве 142 штук. Проанализированы показатели сократительной активности 425 изолированных кольцевых сегментах переднего брыжеечного лимфатического протока, вырезанных из центральной части лимфангионов, содержащей гладкомышечные клетки и помещенных в

рабочие камеры многоканального проволочного миографа Multi Wire Myograph System 610M (DMT, Дания).

Регистрация сократительной активности лимфангионов. В условиях перфузии физиологическим раствором Кребса ($t = 37,0 \pm 0,2^\circ\text{C}$) после проведения нормализации и установления стабильной сократительной активности, занимающей от 30 до 60 минут, регистрировали частоту, амплитуду фазных сокращений и уровень тонического напряжения. После этого в перфузат добавляли растворы тестируемых веществ до достижения необходимой концентрации. Экспозиция составляла 10 минут, после чего вновь регистрировали параметры сократительной активности для оценки эффекта воздействия тестируемыми веществами и производили промывание раствором Кребса для оценки обратимости вызванных сосудистых реакций.

В качестве рабочего раствора для перфузии использовали раствор Кребса, следующего состава (в мМ): NaCl – 118,99; KCl – 4,69; NaHCO₃ – 25,0; KH₂PO₄ – 1,18; MgSO₄×7H₂O – 1,17; CaCl₂×2 H₂O – 2,50; EDTA – 0,03; C₆H₁₂O₆ – 5,5. Непосредственно перед экспериментами свежеприготовленный раствор Кребса в течение 30 мин сатурировали газовой смесью, содержащей 5%CO₂ и 95%O₂.

В качестве тестируемых веществ использовали синтетические селективные агонисты ОР (DAMGO – [D-Ala₂, N-MePhe₄, Gly-ol]-энкефалин – агонист μ -ОР; DADLE – [D-Ala₂, D-Leu₅]-энкефалин – агонист δ -ОР; U-69593 – агонист κ -ОР), эндогенные ОП (β -эндорфин, ЭМ-1, динорфин А) в диапазоне концентраций, включающих эндогенный уровень. Изучение возможных механизмов действия ОП на лимфангионы проведено с использованием селективных и неселективных блокаторов рецепторов, блокаторов ионных каналов и внутриклеточных кальциевых депо.

Для оценки эффективности сократительной функции ЛС был предложен расчетный интегральный показатель – минутная производительность, рассчитанный как «площадь под кривой» (AUC) на миограмме за единицу времени и наиболее адекватно отражающий мощность сокращения ЛС.

Методика тренировки животных на тредбане. Для изучения влияния стрессовых факторов на сократительную активность ЛС была реализована модель регулярных физических нагрузок. Животные выполняли тренировочный бег на тредбане и, после предварительного

тестирования (с 1-го по 3-й день), на 4-й день эксперимента были подвергнуты отбору, заключающемуся в тестовом забеге животных по ленте тредбана при угле её наклона 20°, скорости движения 0,45 м/с и продолжительности 15 минут, после чего проводился расчет индекса «Активности» по формуле (1):

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

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

$T_{\text{общ}}$ – продолжительность оцениваемого периода выполнения физической нагрузки, сек.

В эксперимент отбирались животные, у которых в течение 3 суток удавалось выработать устойчивый навык бега на тредбана с индексом «Активности» не менее 50%. Далее животные подвергались ежедневным тренировкам (кроме выходных дней) в течение трех недель. Условия нагрузки: скорость движения ленты тредбана 0,38 м/с при угле ее подъема 20°, продолжительность 10 минут. На 22-й день исследования отбирались животные, у которых индекс «Активности» достигал 95% и более. Эти животные выполняли бег до полного утомления при скорости движения ленты 60 см/с, после чего проводилась эвтаназия, непосредственно после которой из переднего брыжеечного лимфатического протока вырезались кольцевые сегменты, использованные в экспериментах для оценки роли эндогенных ОП в регуляции сократительной активности ЛС.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выявление реактивности ЛС на действие синтетических агонистов ОП. Наличие реакций со стороны сократительной активности изолированных лимфангионов в ответ на воздействие опиоидных агонистов расценивалось в пользу экспрессии ОП в ЛС, поскольку селективные агонисты рецепторов активируют внутриклеточные сигнальные пути, вызывающие биологический ответ. DAMGO – агонист μ -ОП, оказывал угнетающее влияние на сократительную активность брыжеечных ЛС, при воздействии DADLE – агониста δ -ОП прослеживалась тенденция к снижению моторики ЛС, а U-69593 – агонист κ -ОП оказывал стимулирующее влияние на сократительную активность ЛС (см. рис. 1).

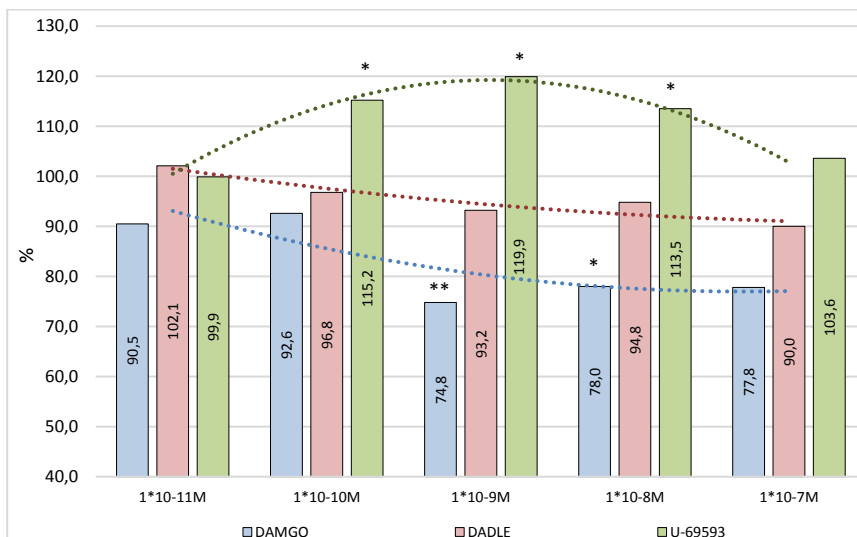


Рисунок 1 – Изменение минутной производительности ЛС при воздействии селективных агонистов ОР. Данные представлены в % по отношению к фону в виде М. *, ** – статистически значимые различия по сравнению с фоновыми значениями ($p \leq 0,05$; $p \leq 0,01$)

Выявленная разнонаправленная реактивность ЛС при действии агонистов ОР, говорит о множественных сигнальных механизмах, вовлекаемых в реализацию биологического эффекта опиоидов.

Установление реактивности ЛС на действие селективных агонистов ОР послужило основанием для проведения исследований по оценке влияния эндогенных агонистов ОР (β -эндорфина (1-31), ЭМ-1 и динорфина А (1-17)) на сократительную активность ЛС, а также механизмов их действия. Диапазон исследуемых концентраций тестируемых веществ – 10^{-12} – 10^{-8} М определялся на основании литературных данных о содержании эндогенных ОП в организме человека и животных (Ozarda Pçöl Y., 2002; Кунельская Н.Л., 2015).

Сократительная активность ЛС при действии β -эндорфина. Изучение механизмов его действия. Установлено, что в диапазоне концентраций 10^{-11} – 10^{-8} М β -эндорфин вызывал практически не зависящее от концентрации угнетение сократительной активности ЛС за счет снижения ЧС и минутной производительности (таблица 1).

Таблица 1 – Изменение параметров сократительной активности изолированных ЛС под действием β-эндорфина. Данные представлены в относительных единицах по отношению к фону, M±SD, n=8

β-эндорфин, М	Частота сокращений	Амплитуда сокращений	Производительность	Тонус
1×10^{-12}	0,99±0,04	1,01±0,03	0,90±0,05	0,98±0,04
1×10^{-11}	0,89±0,07	1,04±0,04	0,83±0,07*	1,03±0,04
1×10^{-10}	0,83±0,07*	0,97±0,05	0,80±0,03*	0,99±0,04
1×10^{-9}	0,83±0,08*	1,09±0,09	0,83±0,03*	1,04±0,08
1×10^{-8}	0,78±0,10*	1,06±0,08	0,81±0,06*	1,08±0,12
Примечание – * – статистически значимые различия по сравнению с фоновыми значениями (p≤0,05)				

Максимальное снижение сократительной активности было зарегистрировано в концентрации 10^{-8} М и составило 23% для ЧС и 19% для минутной производительности в сравнении с фоном (p≤0,05). Поскольку β-эндорфин является неселективным агонистом ОР, для изучения механизмов его действия на ЛС, использовались селективные блокаторы ОР – СТОР (блокатор μ-ОР, 10^{-7} М), налтриндол (блокатор δ-ОР, 2×10^{-7} М), nVNI (блокатор κ-ОР, 10^{-6} М) и было выявлено, что зарегистрированное действие пептида реализуется посредством взаимодействия с μ- и δ-ОР, поскольку на фоне СТОР и налтриндола угнетение моторики лимфангионов β-эндорфином не проявлялось. При этом κ-ОР в реализации полученного эффекта участия не принимают.

Для выяснения внутриклеточных сигнальных путей, при участии которых реализуется угнетающий эффект β-эндорфина на ЛС, проведено исследование с использованием блокаторов K⁺-каналов 4-аминопиридина (4-AP, 10^{-6} М) и глибенкламида (Glb, 10^{-5} М). Установлено, что тормозный эффект β-эндорфина на моторику ЛС реализуется как через активацию потенциал-зависимых K⁺-каналов, так и АТФ-чувствительных. При этом вклад АТФ-чувствительных K⁺-каналов более выражен по сравнению с потенциал-зависимыми. Для оценки участия эндотелий-зависимых механизмов в реализации общего эффекта β-эндорфина проведено исследование с использованием блокатора фермента NO синтазы L-NAME (10^{-6} М). Установлено, что реализация эффекта β-эндорфина на брыжеечные ЛС крысы осуществляется при участии эндотелий-(NO)-зависимых механизмов, поскольку на фоне применения L-NAME

тормозное влияние β -эндорфина на сократительную активность лимфангионов не проявлялось.

Сократительная активность ЛС при действии ЭМ-1. Изучение механизмов его действия. Применение ЭМ-1 в концентрациях 10^{-10} – 10^{-8} М оказывало стимулирующее влияние на фазную активность лимфангионов: наиболее реактивным параметром была минутная производительность, при этом ее максимальное увеличение составило 17% по отношению к фону в концентрации 10^{-8} М, $p \leq 0,05$ (таблица 2).

Таблица 2 – 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 ($p \leq 0,05$).

С учетом определенной общности механизмов, лежащих в основе сократительной активности гладких мышц ЛС и гладких мышц кровеносных сосудов и кардиомиоцитов, представлялось обоснованным ожидание сходного эффекта при действии ЭМ-1 на лимфангионы, как «классического» агониста μ -ОР. Тем более, что при изучении влияния на ЛС селективного агониста μ -ОР DAMGO также было зарегистрировано его угнетающее влияние на сократительную активность ЛС. Однако, в проведенных экспериментах с ЭМ-1 в исследуемом диапазоне концентраций выявлено стабильное стимулирующее влияние сократительной активности, не зависящее от концентрации. При изучении механизмов действия ЭМ-1, обнаружено, налоксон-независимое стимулирующее действие ОП на ЛС, поскольку как на фоне СТОР, так и на фоне налоксона (неселективного блокатора ОР, 3×10^{-6} М), стимулирующее действие ЭМ-1 сохранялось.

При анализе литературы, было обнаружено что эндоморфины имеют сходную структуру с тахикининовыми пептидомиметиками, а

также имеют аффинность, хотя и слабую, к тахикининовым рецепторам первого типа (NK1-рецепторам). Поскольку известно, что в гладкомышечных клетках ЛС экспрессируются NK1-рецепторы, а ЭМ-1 имеет достоверную аффинность к данному типу рецепторов, а эффект субстанции Р на ЛС при активации NK1-рецепторов схож с эффектом ЭМ-1, представлялось целесообразным проведение экспериментов с использованием селективного блокатора NK-1 рецепторов CP-96345 (10^{-6} М). Выявленный стимулирующий эффект ЭМ-1 на ЛС блокировался применением CP-96345, что подтверждает предположение о реализации эффекта ОП через NK-1 рецепторы. Для установления роли ионов Ca^{2+} в вазоактивном действии ЭМ-1 проведены эксперименты с использованием рутениума красного (РК, 10^{-6} М) – ингибитора Ca^{2+} каналов СПР (рианодиновых рецепторов) и гепарина (5 ЕД/мл) – блокатором IP_3 -активируемых кальциевых каналов СПР и выявлена реализация стимулирующего эффекта ЭМ-1 на брыжеечные ЛС крысы за счет рекрутирования ионов Ca^{2+} из внутриклеточных хранилищ, как через рианодиновые рецепторы, так и IP_3 рецепторы.

Сократительная активность ЛС при действии динорфина А.
Изучение механизмов его действия. Применение динорфина А в концентрациях 10^{-11} – 10^{-8} М приводило к стимуляции сократительной активности брыжеечных ЛС. Максимальный эффект был зафиксирован при воздействии динорфина А в концентрации 10^{-10} М. При этом ЧС увеличилась на 18% ($p \leq 0,05$), амплитуда сокращений – на 6%, минутная производительность – на 42% ($p \leq 0,01$), тонус – на 6% (таблица 3). Полученный стимулирующий эффект динорфина А коррелирует с эффектом, зарегистрированным в исследованиях с применением селективного агониста к-ОР U-69593. Полученный эффект динорфина А не проявлялся как на фоне налоксона (неселективного блокатора ОР, 10^{-6} М), так и на фоне пВНИ (селективного блокатора к-ОР, 10^{-6} М), поэтому является налоксон-зависимым и реализуется через к-ОР. Эффект динорфина А на ЛС опосредован активацией Ca^{2+} -каналов внутриклеточных хранилищ, поскольку на фоне РК и гепарина эффект был снижен. При этом вклад IP_3 -рецепторов более существенен, поскольку применение блокатора IP_3 -активируемых Ca^{2+} -каналов СПР гепарина, приводило к большему подавлению стимулирующего влияния динорфина А на моторику ЛС, чем применение РК.

Таблица 3– 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 ($p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$)				

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 (таблица 3). Это связано с изменением формы сокращений, которые до воздействия ОП представляли собой хаотичное чередование одиночных сокращений со сгруппированными, а после воздействия динорфина А регистрировались только сгруппированные сокращения (рисунок 2), в результате чего «площадь под кривой», характеризующая минутную производительность ЛС, возростала. Такое изменение сократительной активности ЛС приводит к увеличению пропульсивной активности лимфангионов и, вероятно, лежит в основе его антиаритмического действия. Этот пример демонстрирует, 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 эффективность сократительной активности лимфангионов.

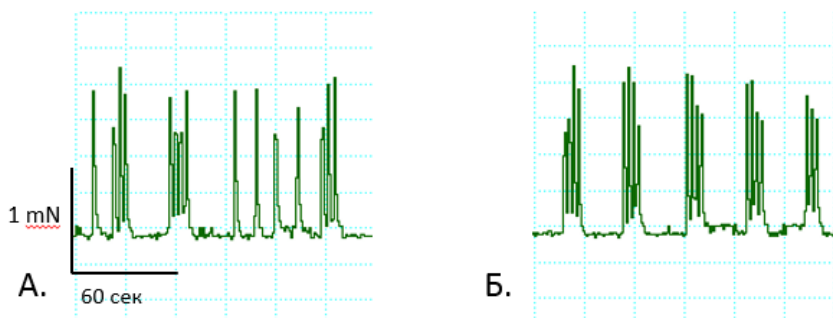


Рисунок 2 – Изменение сократительной активности ЛС при действии динарфина А. А – кривая записи сократительной активности интактных ЛС (фон). Б – кривая записи сократительной активности ЛС при воздействии динарфина А.

Влияние β -эндорфина на сократительную активность ЛС после действия регулярных физических нагрузок. Изучение механизмов действия β -эндорфина на брыжеечные ЛС тренированных животных. При анализе фоновых показателей сократительной активности ЛС тренированных животных выявлены изменения со стороны тонического напряжения, которые характеризовались увеличением в 1,8 раза ($p \leq 0,01$) по сравнению с ЛС интактных животных (таблица 4). Вероятно, такое изменение тонуса является следствием повышения уровня эндотелина-1 в результате регулярных кратковременных интенсивных физических нагрузок, что было выявлено у спортсменов (Смирнов И.Е., 2015). Частота, амплитуда сокращений и минутная производительность в группе тренированных животных были несколько ниже, чем в группе нетренированных животных, без статистически значимых различий (таблица 4). Сниженная минутная производительность ЛС тренированных животных по сравнению с нетренированными животными является следствием более низких показателей фазной активности (частоты и амплитуды сокращений), а также повышенного тонического напряжения. Это, по всей видимости, явилось причиной меньшего заполнения ЛС в диастолу и, как следствие, снижения объема перекачиваемой лимфы.

Таблица 4 – 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	Произв-ть, у.е.	Тонус, mN
Нетренированные крысы	100	$8,64 \pm 0,51$	$0,69 \pm 0,04$	$103,5 \pm 7,1$	$0,85 \pm 0,11$
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 $p \leq 0,01$					

В результате исследования выявлено, что пороговая концентрация β -эндорфина, вызывающая сосудистую реакцию ЛС тренированных животных – 10^{-12} М, что на порядок ниже, чем при воздействии пептида на ЛС нетренированных животных. Во всем изучаемом диапазоне концентраций при воздействии β -эндорфина наблюдалась стимуляция насосной функции ЛС и эти изменения были статистически значимы. Повышение минутной производительности зависело от концентрации, с максимумом при действии эндогенного опиоида в концентрации 10^{-8} М на 17% ($p \leq 0,01$).

Стимулирующее действие β -эндорфина на ЛС тренированных животных противоположно эффекту β -эндорфина на ЛС интактных животных, когда наблюдалось угнетение сократительной активности ЛС в том же диапазоне концентраций (рисунок 3).

В ходе изучения механизмов действия выявленного стимулирующего эффекта β -эндорфина (неселективный агонист ОР) установлено, что полученный эффект является налоксон-зависимым, поскольку на фоне налоксона стимулирующий эффект β -эндорфина отсутствовал полностью. При применении pN1 (блокатора к-ОР) минутная производительность регистрировалась на 10% ($p \leq 0,05$) ниже фоновых значений, что указывает на стимулирующий эффект β -эндорфина реализуемый через к-ОР. Снижение сократительной активности ЛС тренированных животных ниже фоновых показателей при применении блокатора к-ОР на фоне β -эндорфина является результатом влияния ОП на μ -ОР, поскольку при воздействии β -эндорфина на ЛС тренированных животных на фоне СТОР (μ -антагонист), сократительная активность более выражена, чем без блокатора μ -ОР. Таким образом, стимулирующий эффект эндогенного ОП β -эндорфина на ЛС

тренированных животных реализуется посредством κ-ОР. В результате одновременной активации μ-ОР происходит частичное нивелирование полученного эффекта, поскольку через μ-ОР реализуется угнетающий сократительную активность ЛС эффект β-эндорфина.

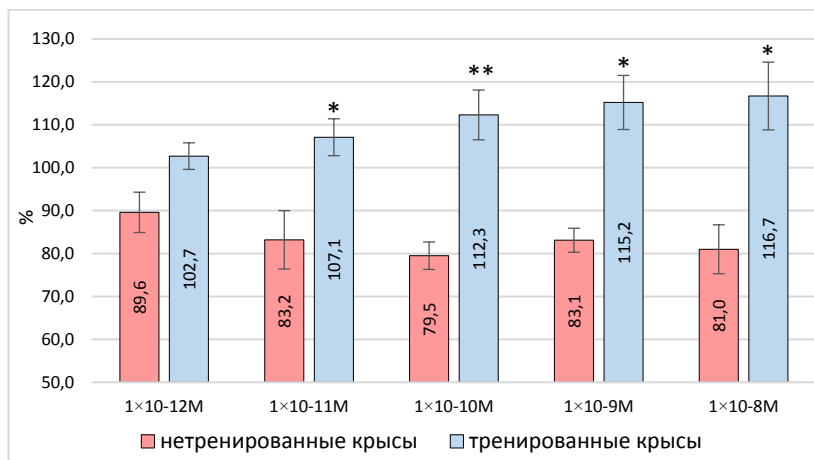


Рисунок 3 – Изменение минутной производительности при действии β-эндорфина на изолированные брыжеечные ЛС тренированных и нетренированных белых крыс. Данные представлены в % в виде М±SD.

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

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, независимое 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 независимое 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 риаудиновых и IP_3 -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 к-ОР и рекрутирования Ca^{2+} из внутриклеточных хранилищ, при участии как риаудиновых, 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 к-ОР.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК:

1. **Нечайкина, О.В.** Влияние β -эндорфина на сократительную активность изолированных лимфатических сосудов крысы / **О.В. Нечайкина**, С.Г. Петунов, А.С. Радилев // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2013. – Т.12. – №3 – С. 64–70.
2. **Нечайкина О.В.**, Петунов С.Г. Влияние эндоморфина-1 на сократительную активность брыжеечных лимфатических сосудов крысы / **О.В. Нечайкина**, С.Г. Петунов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2019. – Т.168, № 7. – С. 63-67.
3. **Нечайкина, О. В.** Опиоидэргическая регуляция сократительной активности лимфатических сосудов / **О. В. Нечайкина**, С. Г. Петунов, Д. С. Лаптев // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2020. – Т. 19, № 3(75). – С. 57-63.

Прочие работы, опубликованные по теме диссертации:

1. **Нечайкина О.В.** Влияние β -эндорфина на сократительную активность лимфатических сосудов крысы / **О.В. Нечайкина**, С.Г. Петунов, Д.В. Бобков // Сборник трудов Всероссийской научной

конференции молодых ученых «Медико-биологические аспекты химической безопасности» – СПб, 2013 г. – С.197-198.

2. **Нечайкина О.В.** Влияние β -эндорфина на сократительную активность лимфатических сосудов / Нечайкина О.В, Петунов С.Г., Бобков Д.В. // Материалы XXII съезда физиологического общества имени И.П Павлова. Волгоград, 2013 г. – С.381-382.

3. Реактивность лимфатических сосудов при действии бета-эндорфина на фоне физической нагрузки / С. Г. Петунов, **О. В. Нечайкина**, А. С. Радилов [и др.] // Материалы XXIII съезда Физиологического общества им. И. П. Павлова с международным участием, Воронеж, 18–22 сентября 2017 года. – Воронеж: Издательство Истоки, 2017. – С. 921-923.

4. **Нечайкина, О. В.** Действие бета-эндорфина на сократительную активность лимфатических сосудов крысы / **О. В. Нечайкина**, С. Г. Петунов, А. С. Радилов // Материалы XXIII съезда Физиологического общества им. И. П. Павлова с международным участием, Воронеж, 18–22 сентября 2017 года. – Воронеж: Издательство Истоки, 2017. – С. 923-925.

5. **Нечайкина, О.В.** Действие эндогенных опиатов на брыжеечные лимфатические сосуды крысы / О.В. **Нечайкина**, С.Г. Петунов, А.С. Радилов // Тезисы к IV Съезду Лимфологов России «Эпоха возрождения». Приложение к журналу ЛИМФА №4. – 2017. – С. 47.

6. Петунов, С.Г. Роль эндотелий-зависимых реакций в механизме действия β -эндорфина на сократительную активность лимфатических сосудов в условиях физической нагрузки / С.Г. Петунов, **О.В. Нечайкина** и др. // Тезисы к VI международной научно-практической конференции по клинической лимфологии «ЛИМФА-2018». Приложение к журналу ЛИМФА №2(6)– 2018. – стр. 66.

7. Влияние β -эндорфина на функциональные параметры изолированного сердца и лимфатических сосудов белой крысы / **О. В. Нечайкина**, Д. С. Лаптев, С. Г. Петунов, А. С. Радилов // Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова. – 2019. – Т. 11, № 2. – С. 43-48.

8. **Нечайкина О.В.**, Петунов С.Г. Влияние селективного агониста каппа-опиоидных рецепторов на сократительную активность брыжеечных лимфатических сосудов крысы / **О.В. Нечайкина**, С.Г. Петунов // Лимфология: от фундаментальных исследований к медицинским технологиям: Материалы XIV международной научно-практической

конференции памяти академика Ю.И. Бородина, 26-27 марта 2021г. – Новосибирск, 2021. – Т.2.– С.14-20.

9. **Нечайкина О.В.**, Петунов С.Г. Эндогенные опиоиды – модуляторы лимфотока / **О.В. Нечайкина**, С.Г. Петунов // Трансляционная медицина. Приложение №3. Тезисы к III Санкт-Петербургскому лимфологическому форуму «Лимфология без границ — путь в 400 лет: спорные вопросы и нерешенные проблемы, достижения и открытия», 2022. – С.43.

10. **Нечайкина О.В.**, Петунов С.Г. Влияние β-эндорфина на сократительную активность лимфатических сосудов крысы при динамических нагрузках / **О.В. Нечайкина**, С.Г. Петунов // Тезисы к XV научно-практическая конференция с международным участием «Лимфология: от фундаментальных исследований к медицинским технологиям» имени академика Ю.И. Бородина, 2023. – С.263-266.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

AUC – «площадь под кривой» (areaunderthecurve)

IP₃ – инозитолтрифосфат

L-NAME – N(омега)-нитро-L-аргинин-метилэфир

NO – оксид азота

ЛС – лимфатические сосуды

ОП – опиоидные пептиды

ОР – опиоидные рецепторы

СПР – саркоплазматический ретикулум

ЧС – частота сокращений

ЭМ-1 – эндоморфин 1

ЭОС – эндогенная опиоидная система