

## Эндотоксин-индуцированные изменения функциональной активности лимфатических сосудов

<sup>1</sup>Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург

<sup>2</sup>Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

**Резюме.** Приводятся результаты изменений сократительной активности лимфатических сосудов, лежащей в основе их транспортной функции, при действии бактериальных токсинов *E. coli* и *S. typhimurium*, а также определения роли эндотелия в механизме дилататорного эффекта липополисахаридов на лимфатические сосуды. Установлено, что липополисахариды *E. coli*, *S. typhimurium* оказывают выраженное тормозное влияние на спонтанный ритм и амплитуду фазных сокращений гладкомышечных клеток изолированных брыжеечных лимфатических сосудов. Одной из точек приложения липополисахаридов на гладкомышечные клетки лимфатических сосудов являются  $Ca^{2+}$ -зависимые калиевые каналы мембраны миоцитов лимфангионов. Ограничение входа  $Ca^{2+}$  в цитоплазму при использовании нитропруссид натрия предотвращает снижение уровня тонического напряжения стенки миоцитов. Выявлено, что часть тормозного эффекта эндотоксинов на миоциты лимфатических сосудов проявляется за счет стимуляции ими эндотелиальных клеток. Липополисахариды стимулируют продукцию этими клетками эндотелиального релаксирующего фактора, который по своей химической структуре является оксидом азота. Эндотелиальный релаксирующий фактор активирует гуанилат-циклазу, которая переводит гуанозинтрифосфат в циклический гуанозинмонофосфат, содержание циклического гуанозинмонофосфата в гладкомышечных клетках сосудов повышается, что приводит к дефосфорилированию легких цепей миозина и расслаблению гладкой мускулатуры.

**Ключевые слова:** лимфатические сосуды, липополисахариды, эндотелий, кальций-зависимые калиевые каналы, тетраэтиламмоний, нитропруссид натрия, оксид азота.

**Введение.** В последние десятилетия в литературе существенно увеличилось количество публикаций, посвященных взаимодействию макроорганизма и микроорганизмов, обитающих в кишечнике, ротовой полости и дыхательных путях. Расчеты показывают, что масса бактерий в кишечнике взрослого человека может достигать 1,5–2 кг. При естественной гибели бактерий в просвет кишечника поступают различные вещества, входившие в состав бактериальной мембраны и цитоплазмы бактерий. В настоящее время в патогенезе многих заболеваний и осложнений большое значение придается нарушениям, развивающимся на уровне микроциркуляторного русла. В организме человека постоянно присутствуют эндотоксины, которые обнаруживаются в кровотоке в норме и при различных видах инфекционной и неинфекционной патологии, что позволяет рассматривать эндотоксины, в частности кишечной микрофлоры, в качестве одного из очень важных (если не первостепенных) факторов патогенеза различной органопатологии и синдромов при целом ряде заболеваний [1–3]. Эндотоксином называют липополисахарид (ЛПС), входящий в состав внешней мембраны клеточной стенки грамотрицательных бактерий. Он обладает широким спектром биологической активности и может взаимодействовать практически со всеми клетками человека и животных. Многочисленными экспериментальными и клиническими исследованиями

установлено, что качественные и количественные изменения эндогенной флоры (не только кишечника) вследствие различных влияний закономерно вызывают системные структурно-функциональные нарушения различных органов [5–7]. Р. Duquenne [9], М.Р. Fink, М.Г. Mythen [10] указывают на то, что лимфатические сосуды играют важную роль в возникновении системной эндотоксемии при несептическом шоке. В преимущественном большинстве исследований микроциркуляторного русла изучалось состояние артериол, кровеносных капилляров и венул. Лимфатические сосуды в очаге поражения слабо изучены. Между тем, функционирование лимфатической системы как второй дренажной системы организма в значительной степени определяет состояние обводнения тканей, развитие патологического процесса и его исход.

**Цель исследования.** Оценить изменения сократительной активности лимфатических сосудов, лежащей в основе их транспортной функции, при действии бактериальных токсинов *E. coli* и *S. typhimurium*, а также определить роль эндотелия в механизме дилататорного эффекта липополисахаридов на лимфатические сосуды.

**Материалы и методы.** Основным объектом исследования были изолированные одиночные лимфангионы отводящих лимфатических сосудов

брыжейки быка диаметром 0,8–2,5 мм. Длина препарата, включающего в себя клапанный участок и часть мышечной манжетки лимфангиона, составляла в среднем 7–8 мм.

Сосуды, заполненные лимфой, извлекались из брыжейки животного через 25–30 мин после забоя и доставлялись в лабораторию в термосе, заполненном физиологическим солевым раствором (в мМ/л: NaCl –120,4; KCl –5,9; NaHCO<sub>3</sub> –15,5; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> –1,2; MgCl<sub>2</sub> –1,2; CaCl<sub>2</sub> –2,5; глюкоза –11,5), насыщенным газовой смесью (95% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub>) и охлажденном до +2–4°C. В дальнейшем препараты хранились в холодильнике при такой же температуре. Все исследования проводились на протяжении 6–8 ч после забора материала.

При исследовании уровня тонического напряжения и параметров спонтанных фазных сокращений одиночных лимфангионов использовался механоэлектрический преобразователь «БМХ1С» фирмы «МЭЛЗ» (Россия). Механотрон обеспечивал измерение силы сокращений сосудистых препаратов в изометрическом режиме. Аноды механоэлектрического преобразователя подключались к мостовой измерительной схеме. Запись результатов осуществлялась на самопишущем приборе «Н 3021/4» фирмы «Прибор-ПК» (Россия).

Исходное напряжение и сила, развиваемые препаратом при сокращении, оценивались путем сравнения отклонений пера самопишущего прибора с калибровочным сигналом. Проведено две серии экспериментов: первая – на сегментах лимфатических брыжеечных сосудов с интактным эндотелием, вторая – на дезэндотелизированных лимфатических сосудах. При этом эндотелий удалялся механически. Исследовалось действие липополисахаридов (ЛПС) *E. coli* и *S. typhimurium* на сократительную активность миоцитов лимфангионов. В первой серии экспериментов изучалась роль циклического гуанинмонофосфата (цГМФ) в расслаблении миоцитов лимфангиона, вызываемом липополисахаридом. В качестве блокатора синтеза цГМФ использовалась метиленовая синька в концентрации 10<sup>-7</sup> М/л. Препараты выдерживались в этом растворе в течение 1 ч до начала эксперимента.

**Результаты и их обсуждение.** Установлено, что сократительный эффект миоцитов лимфатических брыжеечных сосудов с интактным эндотелием после действия ЛПС *E. coli* фирмы «Sigma Chemical» (Соединённые Штаты Америки) проявлялся раньше и был более выраженным по сравнению с эффектом *S. typhimurium* той же фирмы. Выявлено, что эндотоксин *S. typhimurium* в концентрации 1 мг/л приводит к урежению частоты и уменьшению амплитуды фазных сокращений (рис. 1).

При действии эндотоксинов более одной минуты в 55% препаратов спонтанная активность прекращалась. При введении в раствор Кребса на фоне эндотоксинов норадреналина и гистамина в концентрациях 10<sup>-6</sup> М/л фазная сократительная активность восстанавливалась, но с более низкой частотой и амплитудой сокращений миоцитов лимфатических сосудов.

В случае, если эндотоксин вводился на фоне действия тетраэтиламмония (ТЭА) – блокатора калиевых каналов фирмы «Астрахим» (Санкт-Петербург) в концентрации 1 мМ/л, снижения параметров спонтанной активности не происходило. Наблюдалось лишь незначительное уменьшение амплитуды фазных сокращений. Добавление ТЭА на фоне подавления спонтанной активности липополисахаридами восстанавливало фазные сокращения гладкомышечных клеток миоцитов лимфангионов (рис. 2).

При использовании эндотоксинов в концентрации 10 мг/л наблюдалось быстрое снижение амплитуды и частоты фазных сокращений с последующим прекращением спонтанной активности. В 59% случаев развивалось выраженное и длительное снижение уровня тонического напряжения стенки миоцитов лимфатических сосудов (рис. 3).

Добавление в раствор Кребса на фоне действия ЛПС в концентрации 10 мг/л норадреналина и гистамина в концентрации 10<sup>-6</sup> М/л несколько повышало уровень тонического напряжения и стимулировало появление фазной активности в 17% исследуемых препаратов брыжеечных лимфатических сосудов. При этом амплитуда и частота вызванных фазных сокращений были существенно меньше по сравнению с исходными.

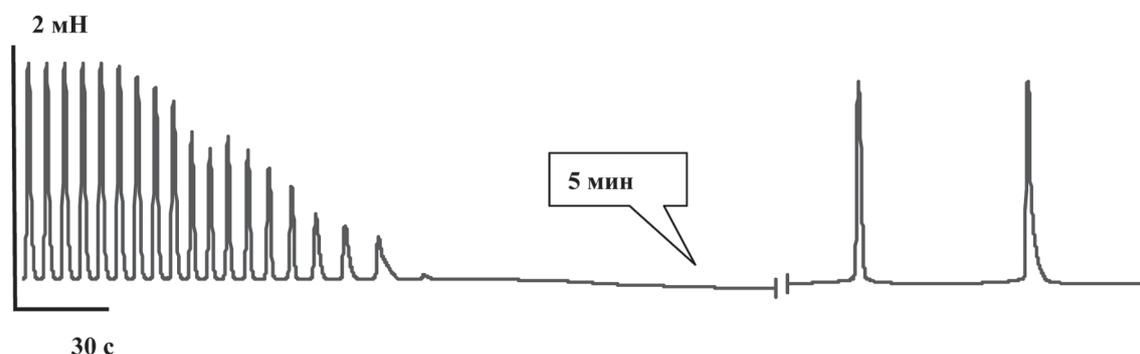


Рис. 1. Действие липополисахарида *S. typhimurium* в концентрации 1 мг/л на сократительную функцию лимфатического сосуда брыжейки быка

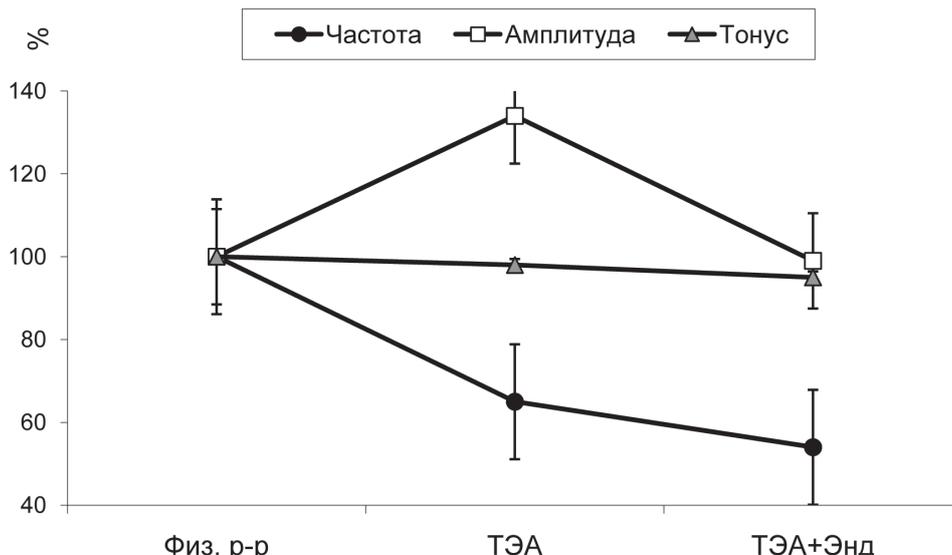


Рис. 2. Обобщенные данные действия эндотоксина *E. coli* в концентрации 1 мг/л на сократительную функцию гладкомышечных клеток лимфатических сосудов на фоне действия блокатора калиевых каналов мембраны гладкомышечных клеток. В физиологическом растворе амплитуда и частота фазных сокращений и уровень тонуса приняты за 100%. В средней части графиков те же показатели на фоне действия ТЭА ( $1 \times 10^{-5}$  М/л). Справа – те же показатели через 10 мин после действия эндотоксина (Энд) *E. coli* (10 мг/л) на фоне ТЭА

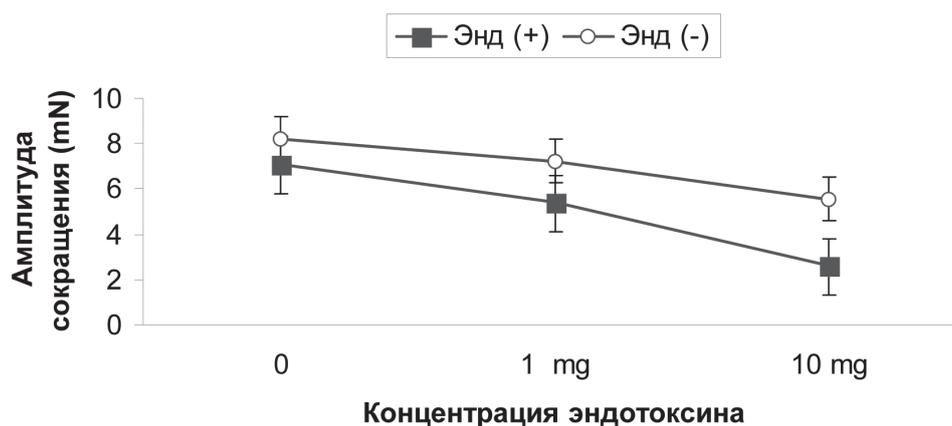


Рис. 3. Амплитуда тонических сокращений гладкомышечных клеток интактных и деэндотелизированных лимфангионов, предварительно сокращенных норадреналином ( $1 \times 10^{-6}$  М/л) при действии эндотоксина *E. coli* в концентрации 1 и 10 мг/л (на 5-й мин действия)

Добавление в раствор Кребса на фоне действия ЛПС нитропруссид натрия фирмы «Pharmachim Holding EAD, Sopharma AD» (Болгария) в концентрации  $10^{-6}$  М/л предотвращало снижение уровня тонического напряжения стенки миоцитов лимфатических сосудов. Введение в раствор ТЭА в концентрации 1 мМ/л на фоне подавления спонтанного ритма липополисахаридом в концентрации 10 мг/л стимулировало появление фазной активности. Последующее добавление в этот раствор, содержащий ТЭА и ЛПС, нитропруссид натрия подавляло вызванную фазную активность. При этом снижения тонуса стенки миоцитов не наблюдалось.

Введение ЛПС в концентрации 10 мг/л на фоне ингибирования гуанилат-циклазы метиленовой синькой сопровождалось незначительным уменьшением частоты и амплитуды фазных сокращений на фоне исходного уровня тонического напряжения стенки миоцитов лимфатических сосудов (рис. 4).

На деэндотелизированных лимфатических сосудах эффект ЛПС на спонтанные сокращения гладкомышечных клеток лимфатических сосудов проявлялся значительно слабее. Эффект ЛПС в концентрации 1 мг/л на деэндотелизированных препаратах обычно проявлялся в небольшом снижении частоты и амплитуды фазных сокращений (рис. 5).

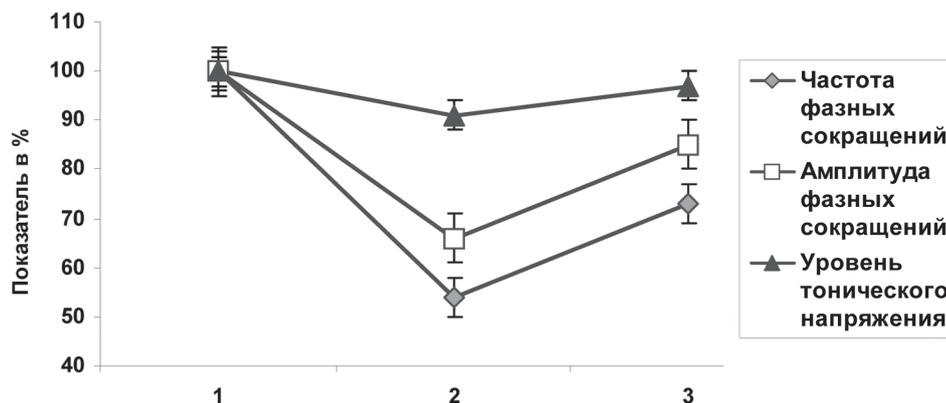


Рис. 4. Амплитуда и частота фазных сокращений гладкомышечных клеток лимфангионов при действии ЛПС *E. coli* (1 мг/л) в растворе Кребса и в присутствии метиленового голубого ( $1 \times 10^{-5}$  М/л). 1 – исходные параметры – 100%, 2 – параметры на второй минуте действия ЛПС *E. coli*, 3 – то же, но после предварительной 10-минутной инкубации лимфангиона в растворе с метиленовым голубым ( $10^{-5}$  М/л)

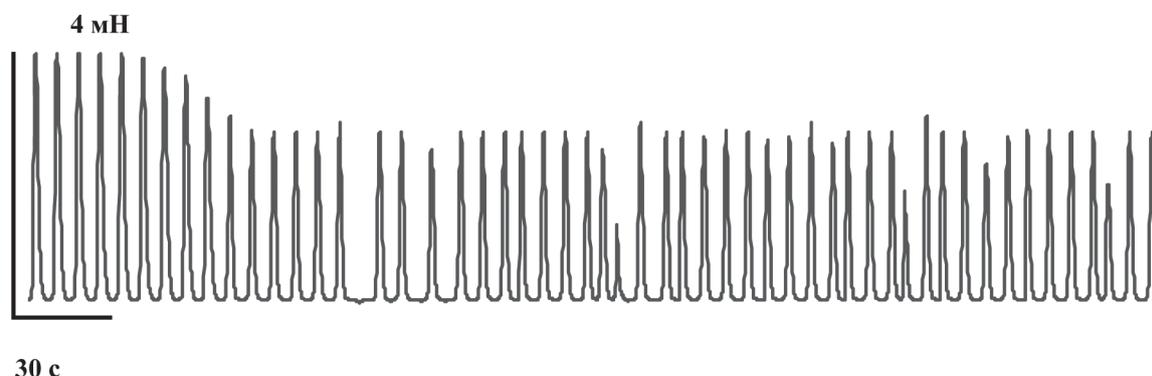


Рис. 5. Действие эндотоксина *E. coli* в концентрации 1 мг/л на сократительную активность гладкомышечных клеток деэндотелизированного лимфатического сосуда

Введение в раствор Кребса ЛПС в концентрации 10 мг/л подавляло спонтанный ритм сокращений лишь в 26% случаев. При этом тонус стенки гладкомышечных клеток лимфатических сосудов, как правило, не изменялся. Добавление в раствор Кребса на фоне ЛПС в концентрации 10 мг/л ТЭА (1 мМ/л) сопровождалось увеличением частоты и амплитуды фазных сокращений, причем у 2/3 препаратов эти параметры на фоне действия ТЭА превышали исходные.

**Заключение.** Установлено, что липополисахариды *E. coli*, *S. typhimurium* и других микроорганизмов оказывают выраженное тормозное влияние на спонтанный ритм и амплитуду фазных сокращений гладкомышечных клеток изолированных брыжеечных лимфатических сосудов быка. В случае воздействия высокими концентрациями ЛПС *E. coli* наблюдается выраженное снижение уровня тонического напряжения миоцитов лимфатических сосудов. Восстановление фазной активности при добавлении ТЭА и предотвращение подавления спонтанного ритма предварительным введением ТЭА дают основания полагать, что ЛПС оказывает свой эффект на мембрану

миоцитов лимфатических сосудов посредством открытия дополнительной группы калиевых каналов.

Ограничение входа  $Ca^{2+}$  в цитоплазму при использовании нитропруссид натрия предотвращает снижение уровня тонического напряжения стенки миоцитов. Таким образом, одной из точек приложения ЛПС на гладкомышечные клетки лимфатических сосудов являются  $Ca^{2+}$ -зависимые калиевые каналы мембраны миоцитов лимфатических сосудов.

Удаление эндотелия сопровождается значительным снижением тормозного эффекта ЛПС на сократительную деятельность лимфатических сосудов. Ингибирование гуанилат-циклазы миоцитов путем применения метиленовой синьки на препаратах с интактным эндотелием также снижает тормозный эффект ЛПС. Выявлено, что часть тормозного эффекта эндотоксинов на миоциты лимфатических сосудов проявляется за счет стимуляции ЛПС эндотелиальных клеток. Известно, что эндотелиальные клетки лимфатических сосудов при действии ацетилхолина, аденозина и некоторых других агонистов, а также при их механической стимуляции способны выделять оксид азота [8]. Следовательно, вторым механизмом

тормозного влияния эндотоксинов на миоциты лимфатических сосудов является стимуляция ими эндотелиоцитов, продукции оксида азота. Эндотелиальный релаксирующий фактор активирует гуанилат-циклазу миоцитов, что приводит к повышению содержания цГМФ, дефосфорилированию легких цепей миозина и расслаблению гладкомышечных клеток лимфатических сосудов.

### Литература

1. Арутюнов, Г.П. Микрофлора кишечника у больных хронической сердечной недостаточностью как возможный фактор возникновения и генерализации системного воспаления / Г.П. Арутюнов, Л.И. Кафарская, В.К. Власенко // Журн. сердечной недостаточности. – 2003. – Т. 4, № 5. – С. 256–260.
2. Бондаренко, В.М. Дисбактериоз кишечника как клинико-лабораторный синдром: современное состояние проблемы / В.М. Бондаренко, Т.В. Мацулевич – М.: ГЭОТАР-медиа, 2007. – 304 с.
3. Лиходед, В.Г. Антиэндотоксиновый иммунитет в физиологии и патологии человека / В.Г. Лиходед, М.Ю. Яковлев, А.Е. Мосежний // Мед. экстрем. ситуаций. – 1999. – № 1. – С. 22–26.
4. Лиходед, В.Г. Антиэндотоксиновый иммунитет в регуляции численности эшерихиозной микрофлоры кишечника / В.Г. Лиходед, М.Ю. Яковлев. – М.: Медицина, 2007. – 215 с.
5. Лиходед, В.Г. Экзогенные и эндогенные факторы в патогенезе атеросклероза. Рецепторная теория атерогенеза / В.Г. Лиходед, В.М. Бондаренко, А.Л. Гинцбург // Росс. кардиол. журнал. – 2010. – № 2. С. 92–96.
6. Рябиченко, Е.В. Роль кишечной бактериальной аутофлоры и ее эндотоксина при патологии человека / Е.В. Рябиченко, В.М. Бондаренко // Журнал микробиол. – 2007. – № 3. – С. 103–111.
7. Рябиченко, Е.В. Роль дисфункции кишечного барьера в поддержании хронического воспалительного процесса различной локализации / Е.В. Рябиченко, В.М. Бондаренко // Журн. микробиол. – 2010. – № 1. – С. 92–100.
8. Яковлев, М.Ю. Элементы эндотоксиновой теории физиологии и патологии человека / М.Ю. Яковлев // Физиол. человека. – 2003. – Т. 29, № 4. – С. 476–485.
9. Duquenne, P. Measurement of endotoxins in bioaerosols at workplace: a critical review of literature and a standardization issue / P. Duquenne // Ann. occup. hyg. – 2013. – № 57 (2). – P. 137–172.
10. Fink, M.P. The role of gut-derived endotoxin in pathogenesis of multiple organ dysfunction / M.P. Fink, M.G. Mythen // Endotoxin in health and disease. Bradeetal. (ed.). N.Y. Basel. – 1999. – С. 854–864.

N.A. Kubyshkina, V.V. Gaivoronskaya, V.Ya. Apchel

### Endotoxin-induced alterations of functional activity of lymphatic vessels

**Abstract.** Here are presented the results of changes of contractile activity of the lymphatic vessels lying in the basis of their transport functions, under the action of bacterial toxins *E. coli* and *S. typhimurium*, as well as determining the role of endothelium in the mechanism the effect of dilatation of lipopolysaccharides on the lymphatic vessels. It is established that lipopolysaccharide *E. coli*, *S. typhimurium* have a marked inhibitory effect on the spontaneous rhythm and amplitude of phasic contractions of smooth muscle cells of isolated mesenteric lymph vessels. One of the points of application of lipopolysaccharides on the smooth muscle cells of the lymphatic vessels are  $Ca^{2+}$ -dependent potassium channels membranes of myocytes of lymphangion. Limit entry of  $Ca^{2+}$  in the cytoplasm when using nitroprusside sodium prevents reduction of tonic tension in wall myocytes. It is revealed that part of the inhibiting effect of endotoxins in the smooth muscle cells of the lymphatic vessels is manifested by stimulating their endothelial cells. Lipopolysaccharides stimulate the production of these cells endothelial relaxing factor, which in its chemical structure is nitric oxide. Endothelial relaxing factor activates guanylat-cyclase, which converts guanosine triphosphate into cyclic guanosine monophosphate, guanosine monophosphate content in vascular smooth muscle cells increased, which leads to dephosphorylation of myosin light chain and smooth muscle relaxation.

**Key words:** lymphatic vessels, lipopolysaccharides, endothelium, calcium-dependent potassium channels, tetraethylammonium, sodium nitroprusside, nitric oxide.

Контактный телефон: 8 (921) 957-22-79; e-mail: natkub@mail.ru