

## **ИЗОЛИРОВАННЫЕ ЛИМФАТИЧЕСКИЕ СОСУДЫ БЕЛОЙ КРЫСЫ КАК МОДЕЛЬ В ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ**

О.В. Нечайкина, С.Г. Петунов, Д.С. Лаптев, Д.В. Бобков

ФГУП «НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России,  
188663, Россия, Ленинградская область, Всеволожский район, п.г.т. Кузьмолловский,  
станция Капитолово, корпус 93. Тел:(812) 606-62-80. Эл.почта: [niigpech@rihophe.ru](mailto:niigpech@rihophe.ru)

**Резюме.** Изолированные лимфатические сосуды крысы были представлены как объекты токсикологического исследования. С использованием предложенной методики показано влияние длительной (в течение 60 дней) ингаляции диоктилтерефталатом в дозах 3,4, 18,6 и 96,8 мг/м<sup>3</sup> на изменение фоновых показателей сократительной активности лимфатических сосудов; обнаружено изменение адренореактивности лимфангионов затравленных животных; показана возможность определения сохранности функции эндотелия лимфатических сосудов.

**Ключевые слова:** изолированные лимфатические сосуды, диоктилтерефталат, адренореактивность, эндотелий зависимые реакции.

## **ISOLATED LYMPHATIC VESSELS OF THE WHITE RAT AS A MODEL IN TOXICOLOGICAL RESEARCH.**

O.V. Nechaykina, S.G. Petunov, D.S. Laptev, D.V. Bobkov

Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology, FMBA, 188  
663, Russian Federation, Leningrad region, Vsevolozhsk district, p. Kuzmolovsky, station  
Kapitolovo, building 93. Tel: (812) 606-62-80. E-mail: [niigpech@rihophe.ru](mailto:niigpech@rihophe.ru)

**Abstract.** Isolated rat lymphatic vessels were presented as toxicological test subjects. Using the proposed method, the effect of prolonged (within 60 days) inhalation of dioctyl terephthalate in doses of 3.4, 18.6 and 96.8 mg/m<sup>3</sup> on the change in the background indicators of the contractile activity of the lymphatic vessels is shown; a change in the adrenoreactivity of the lymphangions of the inoculated animals was found; the possibility of determining the safety of the function of the endothelium of the lymphatic vessels has been shown.

**Key words:** isolated lymphatic vessels, dioctyl terephthalate, adrenoreactivity, endothelium-dependent reactions.

**Введение.**

Лимфатическая система играет важную роль в поддержании гомеостаза тканей, обеспечивая дренаж интерстициального пространства путем активного перемещения жидкости и макромолекул по лимфатическим сосудам, обеспечивая тем самым возврат избытка ультрафильтрата в системный кровоток и предотвращая возникновение отеков. Кроме того, лимфатическая система, являясь компонентом иммунной системы, осуществляет дезактивацию ксенобиотиков, в том числе антигенов. Главным свойством лимфатических сосудов, позволяющим выполнять эти функции, является спонтанная ритмическая сократительная активность их функциональных единиц – межклапанных сегментов (лимфангионов), которая модулируется при участии различных физиологически факторов. Состав интерстициальной жидкости в различных частях макроорганизма непостоянный, что приводит к формированию адаптивных изменений сократительной функции лимфатических сосудов. Это в полной мере относится к влиянию ряда как внешних, так и внутренних факторов: механических, нервных и гуморальных, равно как и ксенобиотиков и токсикантов. Обеспечивая транспорт лимфы в условиях низкого гидродинамического давления, лимфатические сосуды являются чрезвычайно чувствительной структурой, тонко реагирующей на предъявляемый стимул, что позволяет рассматривать их как модели в различных исследованиях, в том числе и токсикологических.

Целью данной работы было оценка возможности использования лимфатических сосудов как модели для изучения влияния промышленных токсикантов, обладающих вазотропной активностью (на примере диоктилтерефталат (ДОТФ)) [1]

**Материалы и методы**

Объектом исследования являлись кольцевые изолированные сегменты краниального брыжеечного лимфатического протока взрослых белых крыс-самцов массой 250-300 г. Исследования на биообъектах выполняли с соблюдением правил биоэтики, утвержденных Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других целей.

Животные были разделены на четыре экспериментальные группы по 6 особей в каждой: контроль (интактные сосуды), ДОТФ (max), ДОТФ (med), ДОТФ (min). Крысы подвергались затравке путем ингаляции ДОТФ ежедневно в течение 60 дней по четыре часа в дозах: ДОТФ (max) – 96,8 мг/м<sup>3</sup>, ДОТФ (med) – 18,6 мг/м<sup>3</sup>, ДОТФ (min) – 3,4 мг/м<sup>3</sup>.

Эксперименты проводили на сегментах лимфатических сосудов с выраженной фазной активностью согласно методике, описанной ранее [2]. Кольцевые сегменты лимфатических сосудов помещались в рабочую камеру миографа Multi Wire Myograph System DMT 610M с проточным термостатируемым ( $37,0 \pm 0,2^\circ\text{C}$ ) раствором Кребса. Параметры сократительной активности лимфатических сосудов регистрировали с помощью системы PowerLab Data (ADInstruments, USA) с последующей обработкой в программе «LabChart 7.0». Регистрировали уровень тонического напряжения, частоту и амплитуду фазной активности лимфатических сосудов.

После завершения нормализации регистрировали исходный уровень спонтанной активности лимфангиона в каждой группе животных, после чего проводили оценку степени сохранности констрикторных и эндотелий зависимых реакций сосуда. С этой целью в рабочую камеру миографа добавляли вазоактивные препараты: норадреналина гидрохлорид – НА ( $1 \times 10^{-6}\text{M}$ ), KCl (20 mM), ацетилхолина хлорид – АХ ( $1 \times 10^{-6}\text{M}$ ) [3].

Статистическую обработку проводили в программе «GraphPad Prism 5.04». Сравнение данных проводили с использованием t-критерия Стьюдента или T-критерия Вилкоксона для связанных выборок, для выявления межгрупповых различий применяли U-критерий Манна-Уитни.

### Результаты и обсуждение

Курсовое 60-дневное ингаляционное применение ДОТФ в исследуемых дозах приводило к изменениям параметров сократительной активности лимфатических сосудов по сравнению с контролем. Данные представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Параметры сократительной активности изолированных лимфатических сосудов при курсовой ингаляционной заправке ДОТФ в течение 60 дней ( $M \pm SE$ )

Группа животных	Амплитуда сокращений, mN	Частота сокращений, мин <sup>-1</sup>	Тоническое напряжение, mN
Контроль	$0,99 \pm 0,06$	$7,31 \pm 0,48$	$1,62 \pm 0,18$
ДОТФ min	$1,01 \pm 0,07$	$8,26 \pm 0,95$	$1,63 \pm 0,24$
ДОТФ med	$0,98 \pm 0,06$	$4,91 \pm 0,45$	$1,03 \pm 0,10$
ДОТФ max	$1,13 \pm 0,07$	$3,49 \pm 0,41$	$0,99 \pm 0,09$

Как видно из представленных данных, при использовании ДОТФ в средней и максимальной дозе наблюдалось снижение частоты спонтанных сокращений и

тонического напряжения, при этом максимальная доза ДОТФ способствовала также увеличению амплитуды одиночных сокращений.

Так как параметры фазной активности лимфатических сосудов характеризуются большой вариабельностью, при анализе влияния изучаемых веществ использовали относительные единицы, характеризующие динамику частоты, амплитуды фазной активности и изменение сосудистого тонуса лимфангионов по сравнению с фоновыми значениями.

При оценке реактивности лимфатических сосудов в контрольной и исследуемых группах животных к действию НА, который применяется как стимулятор сократительной активности сосудистых объектов исследования [4], выявлена различная динамика, представленная на рисунках 1 и 2. Данные, приведенные на рисунке 1, показывают, что применение ДОТФ вызывает более выраженное увеличение частоты фазной активности под влиянием НА, нежели в интактных сосудах. При этом, с учетом исходно более низких показателей частоты фазной активности лимфангионов из экспериментальной группы, получавшей ДОТФ в максимальной дозе, установлено, что при действии НА данный показатель более чем в 2 раз превышал значения интактных сосудов. Это свидетельствует о формировании существенных функциональных изменений лимфатических сосудов под влиянием ДОТФ, проявляющихся в значительном повышении скорости медленной деполяризации. Выявленные изменения были полностью обратимыми: частота фазной активности восстанавливалась через 20 минут после удаления НА из перфузата.

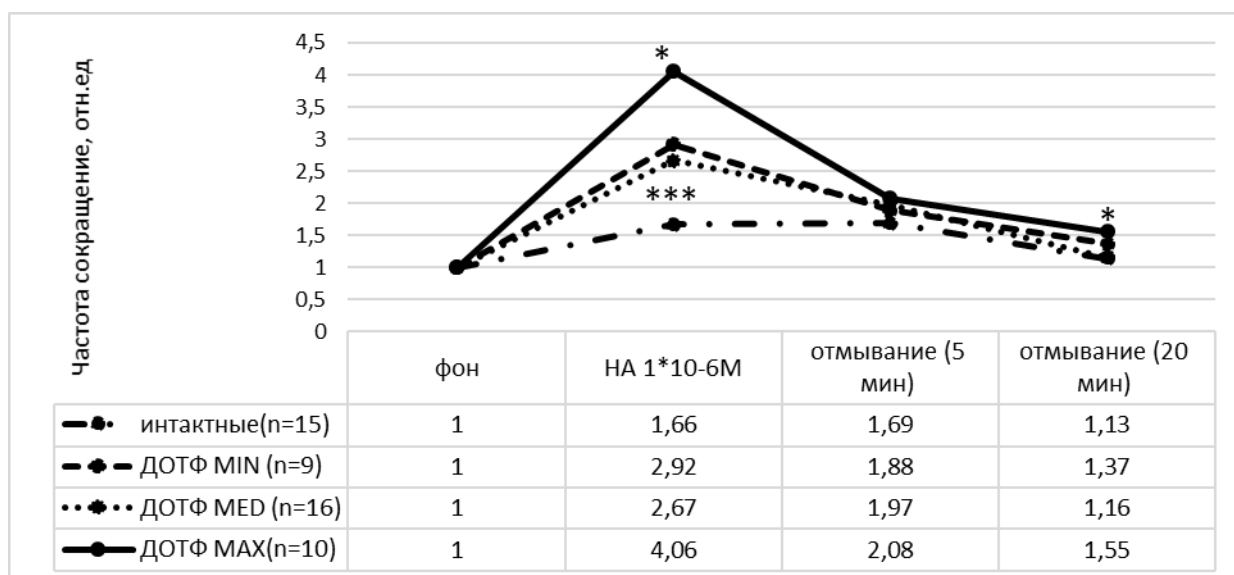


Рисунок 1 – Изменение частоты сокращений интактных лимфатических сосудов и лимфатических сосудов после хронического воздействия ДОТФ при действии НА по

отношению к фону. Данные представлены в относительных единицах в виде М. \*- статистически значимые отличия (\*-  $p \leq 0,05$ ; \*\* -  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*- $p \leq 0,001$ )

Изменение амплитуды сокращений в исследуемых группах, которое представлено на рисунке 2, характеризовались менее выраженными изменениями, однако во всех экспериментальных группах при действии НА, амплитуда сокращений была ниже, чем контрольной группе.

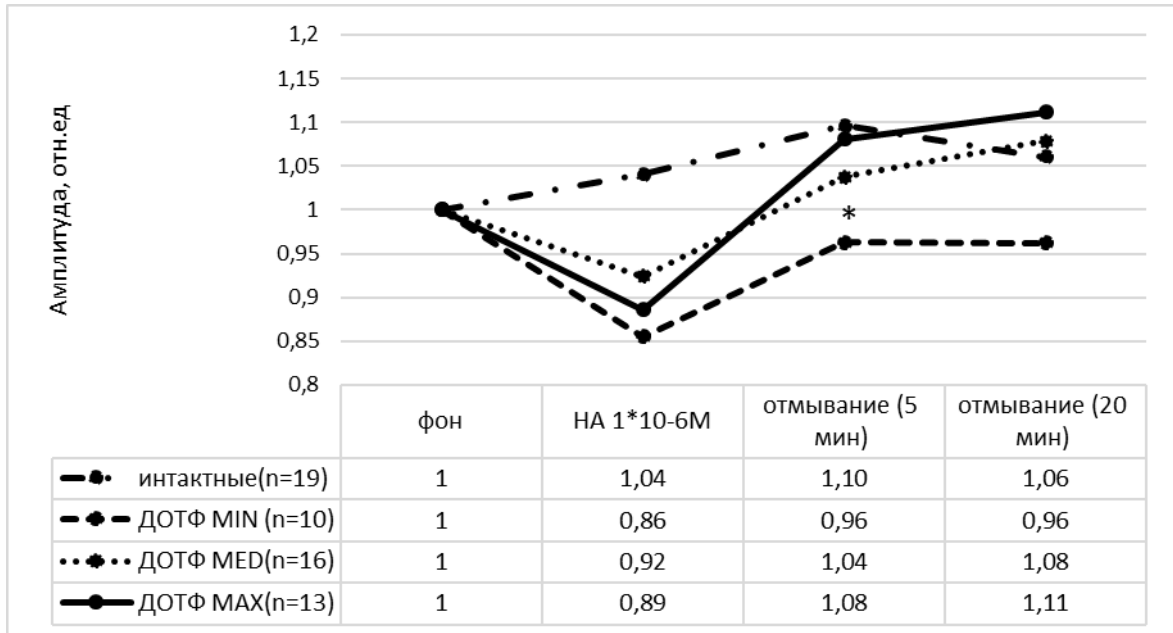


Рисунок 2 – Динамика амплитуды фазных сокращений лимфатических сосудов после хронического воздействия ДОТФ при действии НА. Данные представлены в относительных единицах в виде М. \*- статистически значимые отличия (\*-  $p \leq 0,05$ )

Тонические реакции лимфатических сосудов на НА в опытных группах животных были также более выраженными: увеличение тонуса было на 17 – 48% больше, чем у интактных сосудов. Данные представлены в виде диаграммы на рисунке 3.

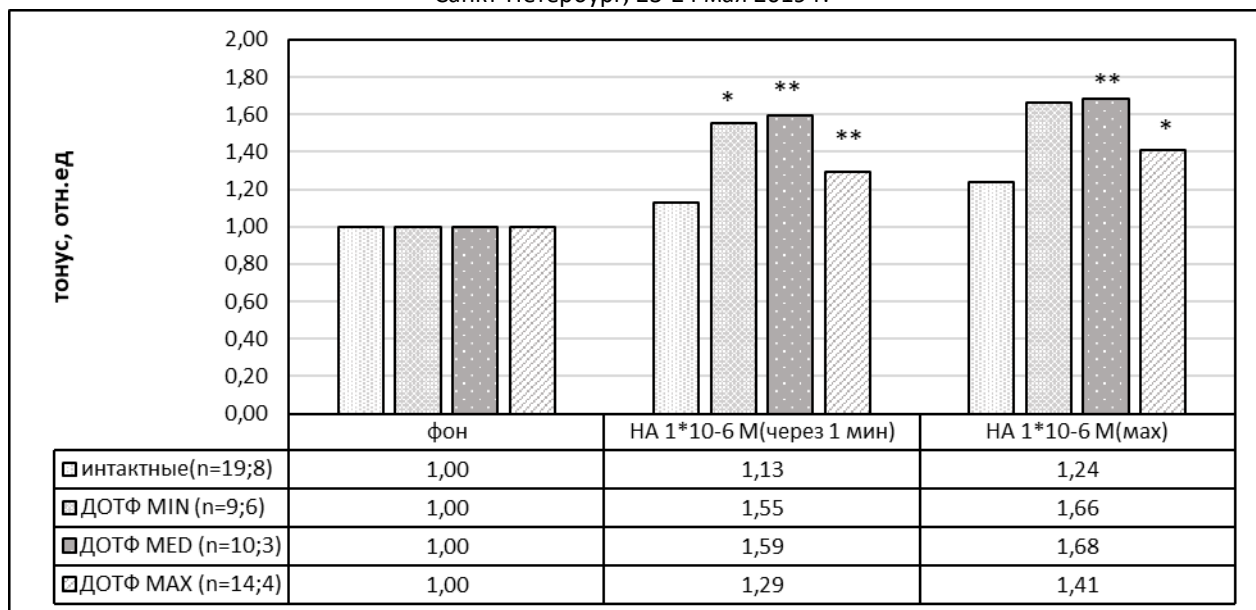


Рис. 3 – Тоническая реакция лимфатических сосудов после хронического воздействия ДОТФ под действием НА. Данные представлены в относительных единицах в виде М. \*- статистически значимые отличия (\*-  $p \leq 0,05$ ; \*\* -  $p \leq 0,01$ )

Выявленная динамика показателей сократительной активности лимфангионов может свидетельствовать о неблагоприятном влиянии ДОТФ на их транспортную функцию: увеличение тонической компоненты сокращения вследствие повышенной адренореактивности не позволяет полноценному заполнению сегментов лимфангионов в диастолу. Увеличение частоты фазной активности наряду с некоторым снижением амплитуды делает одиночные сокращения менее эффективными для перемещения лимфы в проксимальный сегмент.

В следующей серии экспериментов исследовали сохранность эндотелий зависимых реакций лимфатических сосудов при действии ДОТФ, для чего применяли АХ на фоне предсокращения, вызванного 20 мМ раствором КСl [5]. Как показали результаты экспериментов, тоническая реакция на КСl во всех опытных группах была выше на 14–27% в сравнении с контрольной (рисунок 4). Иными словами, применение ДОТФ способствовало увеличению реактивности лимфатических сосудов к действию деполаризующего стимула.

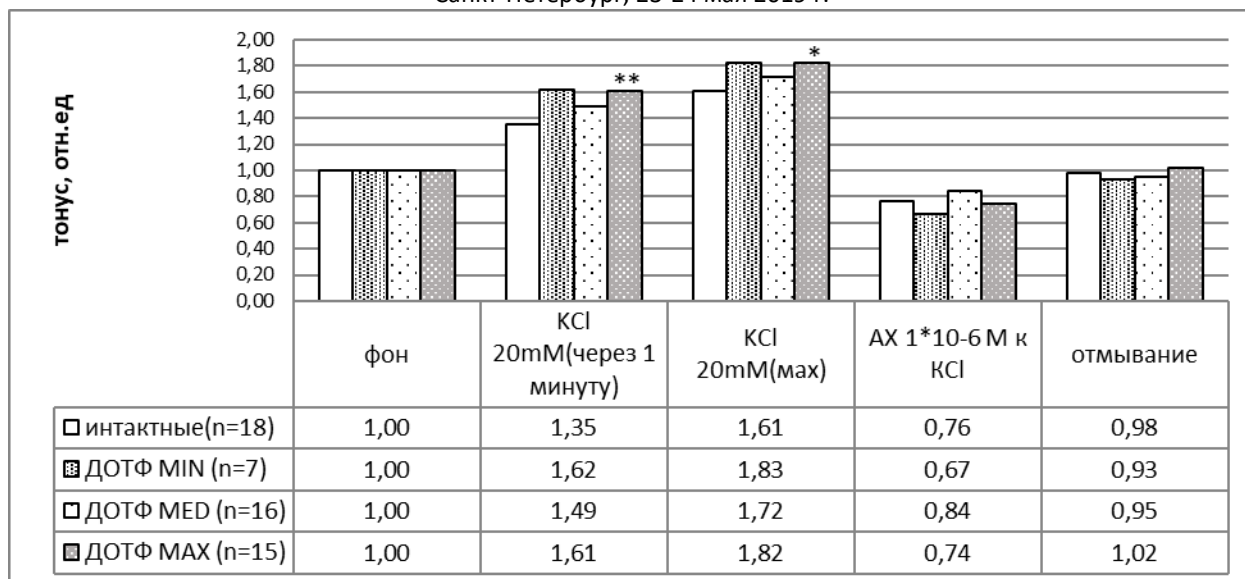


Рис. 4 – Изменение тонической реакции интактных лимфатических сосудов и лимфатических сосудов после хронического воздействия ДОТФ под действием АХ на фоне КСl. Данные представлены в относительных единицах в виде М. \*- статистически значимые отличия (\*-  $p \leq 0,05$ ; \*\* -  $p \leq 0,01$ )

При использовании АХ в предсокращенных лимфатических сосудах экспериментальных и контрольной групп выявлена сходная динамика тонических реакций, что свидетельствует о сохранности эндотелиальной функции лимфатических сосудов при действии ДОТФ. Все изменения сократительной активности лимфатических сосудов полностью восстанавливались после удаления вазоактивных веществ из перфузата.

### Выводы

Результаты проведенного исследования позволяют заключить, что лимфатические сосуды могут рассматриваться как модель для токсикологических исследований веществ, обладающих вазотропной активностью. Показано, что курсовое 60-дневное ингаляционное воздействие ДОТФ способствует формированию гиперреактивности миоцитов лимфатических сосудов, которые при продолжительном воздействии токсиканта могут привести к нарушению их транспортной (и дренажной) функции, при этом концентрация ДОТФ 3,4 мг/м<sup>3</sup> может считаться безопасной для лимфатических сосудов в исследуемом временном диапазоне.

Методика является информативной при оценке механизмов действия токсикантов. Ингаляционная заправка ДОТФ вызывает повышение адренореактивности миоцитов лимфатических сосудов, что может сопровождаться снижением эффективности

перемещения лимфы. Эндотелий зависимые реакции лимфатических сосудов при действии ДОТФ на организм сохранены.

В отличие от большинства кровеносных сосудов, обладающих тонической сократительной активностью, наличие выраженной фазной ритмической активности лимфатических сосудов позволяет рассматривать их как высокоинформативный объект в токсикологических исследованиях.

### Литература

1. Мамонов Р.А. Токсичность диоктилтерефталата / Мамонов Р.А., Федотова Л.А., Печникова И.А., Потапченко Т.Д. // Токсикологический вестник. – 2018. – №6(153) – С. 47-48.
2. Нечайкина О.В. Влияние  $\beta$ -эндорфина на сократительную активность изолированных лимфатических сосудов / Нечайкина О. В., Петунов С.Г., Радилев А.С. // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2013. – №3(47).– С. 64-70.
3. Петунов С.Г. Регуляторные механизмы транспорта лимфы / Петунов С. Г., Орлов Р. С., Кривченко А. И. // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2010. – № 3(35). – С. 4-14.
4. Benoit J.N. Effects of alpha-adrenergic stimuli on mesenteric collecting lymphatics in the rat / Benoit J.N. // Am. J. Physiol.– 1997. – №273 (2). – P.331–336.
5. Панькова М. Н., Лобов Г. И. Обусловленная эндотелием регуляция тонуса лимфатических сосудов // В кн.: Материалы Всерос. конференции «Новое в лимфологии: клиника, теория, эксперимент» – М.: 1993. – С.84.