

Уракова М.А., Брындина И.Г.

Водный баланс легких и оксид азота крови при экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите в условиях капсаициновой блокады блуждающего нерва

ГБОУ ВПО «Ижевская государственная медицинская академия», 426034, г.Ижевск, ул. Коммунаров, д. 281

Цель исследования — изучение водного баланса легких и содержания NO в крови при экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите в условиях капсаициновой блокады блуждающего нерва. **Методика.** Опыты проведены на 47 половозрелых (16-недельных) крысах-самцах массой (220—280 г). Для моделирования экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (ЭАЭ) крысам подкожно вводили энцефалитогенную смесь в полном адьюванте Фрейнда (0,2 мл; содержание убитых микобактерий туберкулеза — 5 мг/мл) из расчета 100 мг гомогената гомологичного спинного мозга на одно животное. Капсаициновую блокаду осуществляли путем двусторонней аппликации 50 мкМ капсаицина («Sigma») на шейную часть блуждающих нервов. Животные были разделены на 4 группы: интактные — контроль 1; модель ЭАЭ; капсаицин на блуждающий нерв + модель ЭАЭ; выделение блуждающего нерва без последующего наложения капсаицина + модель ЭАЭ — контроль 2. Определяли содержание оксида азота в плазме крови, белка в бронхо-альвеолярных смывах, параметры водного баланса легких — количество общей, экстра- и интраваскулярной жидкости и кровенаполнение легких, учитывая содержание гемоглобина крови и легочной ткани, определяемых гемиглобинцианидным методом. **Результаты.** Установлено, что ЭАЭ сопровождается увеличением количества общей, экстраваскулярной жидкости (ЭВЖ) и кровенаполнения легких на фоне повышения содержания оксида азота в артериальной (NO_{арт}) и венозной (NO_{вен}) крови. При ЭАЭ и его сочетании с билатеральной капсаициновой блокадой блуждающего нерва выявлена сильная отрицательная корреляция между коэффициентом NO_{арт} / NO_{вен} и количеством ЭВЖ. Блокада капсаицин-чувствительных афферентов вагуса нормализует нарушенный при ЭАЭ водный баланс легких и восстанавливает уровень оксида азота в плазме крови. **Заключение.** Полученные результаты свидетельствуют об участии капсаицин-чувствительных афферентов блуждающего нерва с вовлечением нитроксидергических механизмов в развитии гипергидратации легких при экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите.

Ключевые слова: водный баланс легких; оксид азота; капсаицин; блуждающий нерв; экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит

Для корреспонденции: Уракова Мария Анатольевна, канд. мед. наук, доцент каф. патофизиологии, e-mail: urakova-mariya@yandex.ru

Для цитирования: Уракова М.А., Брындина И.Г. Водный баланс легких и оксид азота крови при экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите в условиях капсаициновой блокады блуждающего нерва. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60(3): 18—22.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 21.10.15

Urakova M.A., Bryndina I.G.

Water balance of lung and nitrogen oxide in blood at experimental autoimmune encephalomyelitis after capsaicin blockade of vagus nerve

State Budgetary Educational Institution Higher Professional Education «Izhevsk State Medical Academy», 281, Kommunarov str., Izhevsk, 426034, Russia

The purpose of research. To study the water balance of lung and NO level in blood in experimental autoimmune encephalomyelitis combined with capsaicin blockade of vagus nerve. **Methods.** Experiments were conducted on 47 adult (16-week-old) male rats weighing 220—280 g. To simulate the experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) rats were subcutaneously injected with encephalitic mixture in complete Freund's adjuvant (0.2 ml; the content of inactivated *Mycobacterium tuberculosis* was 5 mg/ml) at the rate of 100 mg of homologous spinal cord homogenate per animal. Capsaicin blockade was performed by bilateral application of 50 uM capsaicin («Sigma») on the neck portions of vagus nerves. The animals were divided into 4 groups: intact rats — control group1; rats with EAE; rats with capsaicin application

on vagus nerve + EAE; sham operated rats subjected to vagus nerves allocation without the subsequent capsaicin application + EAE — control group 2. The next parameters were detected: the content of nitric oxide in blood plasma; protein content in broncho-alveolar lavage fluid; lung water balance indices including the amount of total, extra- and intravascular fluid and blood supply of lungs, which were calculated based on wet and dry lung mass and the hemoglobin content in blood and lung tissue determined by hemiglobincyanide method. **Results.** It was found that EAE is accompanied by an increase of total fluid, extravascular fluid (EVF) and blood supply of lungs on the background of increasing content of nitric oxide in arterial (art) and venous (ven) blood. In EAE and its combination with bilateral capsaicin blockade of vagus nerve a strong negative correlation between the NO_{art} / NO_{ven} coefficient and EVF amount was found out. The blockade of capsaicin-sensitive vagal afferents normalized lung water balance impaired in EAE and restored the levels of nitric oxide in blood plasma. **Conclusion.** The obtained results suggest that capsaicin-sensitive vagal afferents with NO-ergic mechanisms involvement take part in the development of pulmonary hyperhydration during experimental autoimmune encephalomyelitis.

Keywords: water balance of the lungs; nitric oxide; capsaicin; the vagus nerve; experimental autoimmune encephalomyelitis.

For citation: Urakova M.A., Bryndina I.G. Water balance of lung and nitrogen oxide in blood at experimental autoimmune encephalomyelitis after capsaicin blockade of vagus nerve. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2016; 60 (2): 18–22. (in Russ).

For correspondence: Mariya A. Urakova, Candidate of Medical Sciences, 281, Kommunarov str., Izhevsk, 426034, Russian Federation, e-mail: urakova-mariya@yandex.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The study had no sponsorship.

Received 21.10.2015

Введение

К настоящему времени экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (ЭАЭ) является общепризнанной моделью для изучения особенностей патогенеза рассеянного склероза в ходе фундаментальных исследований. Различная локализация формирующихся очагов демиелинизации в белом веществе головного и спинного мозга объясняет многообразие клинических проявлений рассеянного склероза, а несостоятельность иммунорегуляторных механизмов, обеспечивающих супрессию аутоиммунного ответа в норме, приводит к прогрессированию заболевания. Среди различных осложнений этой аутоиммунной патологии можно выделить изменения дыхательной системы, характеризующиеся снижением жизненной емкости легких и нарушением газового состава крови [1]. Установлено наличие легочной дисфункции при данном заболевании даже в отсутствие клинической манифестации респираторных синдромов [2].

В условиях формирования патологических процессов, в том числе в дыхательной системе, большое значение приобретает изменение местных регулирующих влияний. Так, установлена важная роль NO в развитии синдрома острого повреждения легких [3]. Вместе с тем, при рассмотрении периферических механизмов регуляции легочных функций обращает на себя внимание «локальная эффекторная функция» афферентов блуждающего нерва [4]. Избирательное влияние на чувствительные тонкие немиелинизированные С-волокна n. vagus оказывает капсаицин. Данный нейро-

токсин вызывает дозозависимый эффект, проявляющийся кратковременным возбуждением с последующей десенситизацией и деструкцией терминалей афферентов [4].

Цель работы — изучение параметров водного баланса легких и содержания NO в крови при экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите в условиях капсаициновой блокады блуждающего нерва.

Методика

Экспериментальные исследования проведены на 47 половозрелых (16-недельных) крысах-самцах массой 220—280 г. Опыты проводились с соблюдением требований Европейской конвенции (Страсбург, 1986) по содержанию, кормлению и уходу за подопытными животными, а также выводу их из эксперимента и последующей утилизации. ЭАЭ индуцировали у крыс (n = 15) путем подкожной инъекции энцефалитогенной смеси в полном адьюванте Фрейнда (0,2 мл; содержание убитых микобактерий туберкулеза — 5 мг/мл) из расчета 100 мг гомогената гомологичного спинного мозга на 1 животное [5]. Контролем служили ложнопереоперированные крысы, которым осуществляли операционный доступ к блуждающим нервам, без их последующего выделения (n = 7) и интактные животные (n = 15). Остальным крысам (n = 10) за 5—7 сут. до моделирования ЭАЭ осуществляли двустороннюю аппликацию 50 мкМ капсаицина («Sigma») на шейную часть блуждающих нервов [6, 7]. Неврологический статус животных оценивали (табл. 1) по выраженности и распространенно-

сти неврологической симптоматики: регистрировали время появления клинических признаков заболевания, его продолжительность и тяжесть, которую оценивали в баллах по клиническому индексу — КИ [5]. КИ спустя 3 недели у 90% животных соответствовал 3—4 баллам.

Таблица 1
Клинический индекс (КИ) животных с ЭАЭ

Клинические симптомы	Количество баллов
Отсутствие клинических симптомов	0
Частичный паралич хвоста	0,5
Полный паралич хвоста	1
Мягкий паразепарез	2
Умеренный паразепарез	3
Полный паралич задних ног или тяжелая атаксия	4
Полный паралич задних ног и недержание мочи	5
Тетраплегия	5,5
Летальный исход	6

Животных выводили из эксперимента спустя 3 нед. путем декапитации под этаминаловым наркозом (30 мг/кг), предварительно накладывали зажим на трахею для предотвращения попадания крови в дыхательные пути. У крыс извлекали легкие и путем трехкратного лаважа 0,9% раствором NaCl получали бронхо-альвеолярные смывы (БАС), в которых определяли содержание белка биуретовым способом («Витал»). В эти же сроки измеряли содержание гемоглобина в крови и легочной ткани гемиглобинцианидным методом при помощи наборов «Био-Лат-Тест» («Erba Lachema», Чехия). На основании полученных данных, а также массы сердца, влажных и высушенных легких рассчитывали количество общей, экстра-, интраваскулярной жидкости и кровенаполнение легких [8]. Количество оксида азота в венозной (NO_{вен}) и артериальной (NO_{арт}) крови оценивали по методике Метельской В.А. [9]. Рассчитывали показатель NO_{арт}/NO_{вен}.

Статистическая значимость отличий изучаемых параметров оценивали с помощью U-критерия Манна—Уитни. Данные представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного (25-й и 75-й процентиля размаха). Различия выборок считали статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$. Обработку статистических данных осуществляли с помощью программного обеспечения «SPSS 22».

Результаты и обсуждение

В ходе исследований установлено увеличение общего количества жидкости легких с 105,45[86,07;115,83]% у интактных животных до 133,33[117,65;160,00]% у крыс с ЭАЭ ($p < 0,05$). При этом происходило повышение экстраваскулярного сектора с 93,51[76,90;104,49]% в контроле до 118,08 [104,34; 146,69]% при аутоиммунной патологии ($p < 0,05$). Количество белка в БАС возрастало с 0,41[0,40;0,42] г/л у контрольных животных до 0,44[0,43;0,46] г/л при ЭАЭ ($p < 0,05$). Кровенаполнение легких увеличивалось с 11,93[9,82;12,94]% в контроле до 16,33[16,04;18,02]% у животных с аутоиммунной патологией ($p < 0,05$). Выявлено, что изменения у ложнопериоперированных животных не отличались от данных интактных крыс. Так как для рассеянного склероза характерно разнообразие поражений структур головного мозга, среди которых часто встречаются очаги, локализованные в гипоталамусе [10], можно предположить наличие дизрегуляторных гипоталамических влияний, обуславливающих гипергидратацию легких. С нашими предположениями согласуются данные, полученные при экспериментальных воздействиях на гипоталамус, которые характеризовались изменением водного баланса легких [11]. Повышенное содержание белка в БАС позволяет высказать предположение о наличии мембраногенного компонента в отеке легких, выявленном при ЭАЭ.

У крыс с ЭАЭ в сочетании с капсаициновой блокадой блуждающего нерва наблюдалось нивелирование изменений водного баланса легких, выявленных у крыс без дополнительного воздействия. Происходило снижение количества общей и экстраваскулярной жидкости легких по сравнению с аутоиммунной патологией головного мозга (до 111,11[108,57;114,18]% и 100,15[98;103,33]% соответственно, $p < 0,05$). Содержание белка в БАС при ЭАЭ в условиях дополнительного капсаицинового воздействия уменьшалось до 0,41[0,40;0,42] г/л и не отличалось от контрольных значений. Легочное кровенаполнение у крыс с аутоиммунной патологией в условиях капсаициновой блокады составляло 12,93[12,24;13,21]% и было статистически значимо ниже, чем у животных без воздействия на *p. vagus*. Известно, что капсаицин, относящийся к ваниллоидам, в концентрации 50 мкМ оказывает нейротоксическое действие на С-афференты терминалей блуждающего нерва, приводящее к прекращению секреции из них нейропептидов (субстанции Р, кальцитонин ген родственного пептида, нейрокина А) [4, 7]. По-видимому, нормализация водного баланса легких, наблюдающаяся при дополнительной аппликации капсаицина на блуждающий нерв, объясняется исключением эффекторных влияний афферентов *p. vagus*, в том числе за счет прекращения локального выделе-

Содержание оксида азота в крови при экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите и двусторонней капсаициновой блокаде блуждающих нервов

	Контроль	ЭАЭ	ЭАЭ + аппликация капсаицина на n. vagus
NO арт, мкмоль/л	49,50 [45,00;52,00]	63,85 [63,15;64] *	50,00 [49,55;50,65] #
NO вен, мкмоль/л	33,00 [29,00;36,00]	59,40 [58,65;59,80] *	34,30 [33,90;34,80] #
NO арт/ NO вен	1,5 [1,25;1,79]	1,07 [1,06;1,08]*	1,47 [1,43;1,48] #

Примечание. * — статистическая значимость различий по сравнению контролем; # — статистическая значимость различий по сравнению с ЭАЭ

ния субстанции P. Имеются сведения о том, что повышение секреции субстанции P, вызванное активацией C-волокон n. vagus, увеличивает экстравазацию плазмы в легочных сосудах [12]. Вместе с тем, механизмы влияния субстанции P на изменение сосудистой проницаемости остаются до конца не выясненными.

Изучение содержания оксида азота в условиях ЭАЭ выявило его повышение в артериальной и венозной крови и снижение коэффициента NO арт/NO вен по сравнению с контролем (табл. 2). Капсаициновая блокада блуждающего нерва устраняла изменения уровня оксида азота в крови и статистически значимое снижение коэффициента NO арт/NO вен (табл. 2).

В литературе последних лет оксид азота (NO) рассматривается как универсальный паракринный и аутокринный регулятор [13]. К настоящему времени выявлено три изоформы NO-синтазы (NOS), участвующих в биосинтезе NO — индуцибельная, нейрональная и эндотелиальная. Основной вклад в его образование в легких вносит эндотелиальная NOS, несмотря на то, что в легочном эндотелии представлены все 3 изоформы [14]. Продуцируемый в эндотелии легких NO играет важную роль в поддержании низкого тонуса сосудов малого круга кровообращения [15]. Высказано предположение, что NO или неизвестный трансмиттер, выделяемый при вагусной стимуляции, через секрецию NO регулирует проницаемость легочных сосудов [16].

Нами выявлена сильная отрицательная корреляция между коэффициентом NO арт/NO вен и количеством экстравазальной жидкости легких как при ЭАЭ ($r = 0,90$; $p < 0,05$), так и при аутоиммунной патологии с дополнительным капсаициновым воздействием ($r = 0,88$, $p < 0,05$). Можно предположить, что в повышении экстравазации плазмы через сосудистую стенку, наблюдаемом при капсаициновой блокаде высвобождения субстанции P из афферентов блуждающего нерва, принимают участие нитроксидергические механизмы. С нашими предположениями согласуются данные авторов, показавших, что увели-

чение проницаемости сосудов легких, вызванное стимуляцией C-волокон блуждающего нерва и сопровождающееся повышенной выработкой нейропептидов, снижается при введении L-NAME — ингибитора синтазы оксида азота [17]. С использованием количественной флуоресцентной микроскопии установлено увеличение коэффициента проницаемости сосудистой стенки для альбумина, связанное с выделением субстанции P и опосредованное выделением NO [18]. Указывается на нитроксидергический механизм действия субстанции P при раздражении ирритантных рецепторов легких, вызванном повышением экстравазации плазмы в паренхиму легких [19].

Таким образом, билатеральная капсаициновая блокада блуждающего нерва при аутоиммунном экспериментальном энцефаломиелите нормализует водный баланс легких и содержание оксида азота в плазме крови. Полученные результаты свидетельствуют об участии капсаицин-чувствительных афферентов блуждающего нерва с вовлечением нитроксидергических механизмов в развитии нейрогенного отека легких при экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите.

References

1. Howard R.S., Wiles C.M., Hirsch N.P., Loh L., Spencer G.T., Newsom-Davis J. Respiratory involvement in multiple sclerosis. *Brain*. 1992; 115 (Pt 2): 479-94.
2. Altintas A., Demir T., Ikitimur H.D. Pulmonary function in multiple sclerosis without any respiratory complaints. *Clin. Neurol. Neurosurg.* 2007; 109 (3): 242-6.
3. Shumatova T.A., Shumatov V.B., Markelova E.V., Sukhoteplaya L.G. The role of nitric oxide and cytokines in the development of acute lung injury. *Vestnik intensivnoy terapii*. 2001; 1: 15-9. (in Russian)
4. Zolotarev V.A., Nozdrachev A.D. Capsaicin-sensitive fibers of the vagus. *Ros. fiziol. zhurn. im. I.M. Sechenova*. 2001; 87 (2): 182-204. (in Russian)
5. Li Z., Liu Wh., Han S., Peng B.W., Yin J., Wu Y.L. Selective inhibition of CCR7(-) effector memory T cell activation by a novel peptide targeting Kv1.3 channel in a rat experimental autoimmune encephalomyelitis model. *J Biol. Chem.* 2012; 287(35): 479-94.
6. Urakova M.A., Bryndina I.G. Surfactant and water balance of lung in intracerebral hemorrhage at conditions of va-

gus nerve capsaicin blockade. *Ros. fiziol. zhurn. im. I.M. Sechenova*. 2015; 101 (3): 308-15. (in Russian)

7. Gamse R., Petsche U., Lembeck F., Jancso G. Capsaicin applied to peripheral nerve inhibits axoplasmic transport of substance P and somatostatin. *Brain Res*. 1982; 239(2): 447-62.

8. Bobrikov A.V., Serikov B.V. Lymphatic drainage and water balance in the lungs during mechanical ventilation with end-expiratory pressure. *Aktual'nye voprosy pul'monologii: Sb. nauchnykh trudov*. 1984; 55-8. (in Russian)

9. Metel'skaya V.A., Gumanova N.G. Nitric oxide: role in the regulation of biological functions, methods of determining human blood. *Laboratornaya meditsina*. 2005; 7: 19-21. (in Russian)

10. Haider L., Simeonidou C., Steinberger G., Hametner S, Grigoriadis N, Deretzi G. Multiple sclerosis deep grey matter: the relation between demyelination, neurodegeneration, inflammation and iron. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 2014; 85 (12): 1386-95.

11. Tel' L.Z., Lysenkov S.P. *Central nervous mechanisms of pulmonary edema: a monograph. [Tsentral'nye nervnye mekhanizmy oteka legkikh: monografiya]*. Alma-Ata, Kazakhstan; 1989. 236 p.

12. Delaunois A., Gustin P., Ansay M. Effects of capsaicin on the endothelial permeability in isolated and perfused rabbit lungs. *Fundam. Clin. Pharmacol*. 1993; 7(2): 81-91.

13. Motavkin P.A., Gel'tser B.I. *Clinical and experimental pathophysiology of lungs. [Klinicheskaya i ehksperimental'naya patofiziologiya legkih]*. Moscow, Nauka; 1998. (in Russian)

14. Voelkel N.F., Rounds Sh. *The pulmonary endothelium*. Wiley-Blackwell; 2009. 511p.

15. Kiely D.G., Lee A.F., Struthers A.D., Lipworth B.J. Nitric oxide: an important role in the maintenance of systemic and pulmonary vascular tone in man. *Br. J. Clin. pharmacol*. 1998; 46(3): 263-66.

16. Liu S.F., Kuo H.P., Sheppard M.N. Vagal-stimulation induces increased pulmonary vascular permeability in guinea-pig. *Amer. J. Respirat. and Crit. Care Med*. 1994; 149 (3): 744-50.

17. Kuo H.P., Liu S., Barnes P.J. The effect of endogenous nitric oxide on neurogenic plasma exudation in guinea-pig airways. *Eur. J. Pharmacol*. 1992; 221 (2-3): 385-88.

18. Nguyen L.S., Villablanca A.C., Rutledge J.C. Substance P increases microvascular permeability via nitric oxide-mediated convective pathways. *Amer. J. Physiology*. 1995; 268: 1060-68.

19. Joad J. P., Kott S. K., Bonham A. C. Nitric oxide contributes to substance P-induced increases in lung rapidly adapting receptor activity in guinea-pigs. *Journal of Physiology*. 1997; 503 (3): 635-43.

Сведения об авторах:

Брындина Ирина Георгиевна, доктор мед. наук, проф., зав. каф. патофизиологии; e-mail: i_bryndina@mail.ru