

ИММУНОФАРМАКОЛОГИЯ

АНТИАНАФИЛАКТОГЕННЫЕ ЭФФЕКТЫ МУСКАРИНОВЫХ АНТАГОНИСТОВ

Г. И. Нежинская, А. Л. Владыкин, Н. С. Сапронов¹

Оценка на модели анафилактического шока протекторного действия мускариновых антагонистов, их комбинаций с антихолинэстеразными средствами или с белками плазмы крови показала, что введение атропина с галантамином (за 30 и 15 мин), метацина с неостигмином (за 40 и 15 мин) или с IgG (за 40 мин) наиболее существенно снижало анафилаксию. В отличие от IgG, альбумин и CRP отменяли антианафилактогенные эффекты метацина, свидетельствуя о важной роли белков плазмы крови в эффектах препаратов. Купирование шока сопровождалось снижением системного иммунного ответа, связанного с активностью В-лимфоцитов селезенки, и нормализацией концентрации серотонина в ней.

Ключевые слова: В-лимфоциты, холинергические антагонисты, антихолинэстеразные средства, анафилактический шок, серотонин

ВВЕДЕНИЕ

Анафилактический шок, при котором происходит неравномерное перераспределение кровотока в результате несогласованной констрикции и дилатации различных сосудистых областей, характеризуется высокой частотой летальных исходов, основными причинами которых являются асфиксия и сосудистый коллапс [6]. Холинергический контроль сократительной активности гладкомышечных клеток респираторного тракта опосредуется через m_3 - и m_2 -холинорецепторы (m -AChR), тонус кровеносных сосудов — через m_3 -AChR эндотелия [7]. Сенсибилизация организма, сопровождающаяся пролиферацией антигенспецифических Т- и В-лимфоцитов и одновременной активацией их холинергической системы по ауто- и паракринному механизмам, формирует иммунологическую стадию шока [7]. Дисфункциональное состояние неейрональной холинергической системы эпителиальных клеток бронхов и бронхоальвеолярных лимфоцитов (снижение экспрессии молекулярных компонентов синтеза и продукции ацетилхолина), вызываемое белковым антигеном, создает условия для развития отека и бронхиальной обструкции при повторном контакте с антигеном [10]. Серотонин (5-НТ), являясь эндогенным аллостерическим активатором n - (никотиновых) AChR [14], способен усиливать эффекты ацетилхолина при действии его на неиннервируемые клетки (иммунные клетки, эпителиоциты и др.) [13].

Целью работы являлась оценка влияния мускариновых антагонистов и их комплексов с антихолинэстеразными средствами или белками плазмы крови на иммунный и медиаторный ответ селезенки при анафилактическом шоке.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на самцах морских свинок ($n = 132$) массой 350 г, полученных из питомника Рапполово РАМН. Каждая группа включала по 4 особи, которые со-

держались в условиях вивария при температуре 23 °С, 12-часовом световом дне и имели свободный доступ к пище и воде.

Анафилактический шок индуцировали у морских свинок, предварительно сенсибилизированных подкожным введением 0,1 мл нормальной лошадиной сыворотки (ЛС) (Ставрополь, Россия). Через 14 дней животным внутрисердечно вводили разрешающую дозу ЛС — 0,5 мл (оценка анафилактического индекса (АИ) Weigle по четырехплюсовой системе [3]).

Антагонисты мускариновых рецепторов атропин (0,08 мг/кг), метацин (0,16 мг/кг), ипратропий (*ипратропия бромид*, 6,2 мкг/кг), антихолинэстеразные средства неостигмин (*прозерин*, 0,04 мг/кг), галантамин (0,4 мг/кг) [1], очищенные белки плазмы крови — альбумин (Будапешт, Венгрия) (500 мг/кг), IgG (Санкт-Петербург, Россия) или CRP (ICN, США) (1 мг/кг) вводили внутривенно за 30 мин до шока. Атропин с галантамином (*центральное действие*) инъецировали за 30 и 15 мин, а метацин с неостигмином или белками плазмы крови (*периферическое действие*) — за 40 и 15 мин до шока. В контроле сенсибилизированные свинки получали физиологический раствор.

Количество антителообразующих клеток (АОК/10⁶ спленоцитов) и содержание 5-НТ (нг/мг белка) в селезенке определяли через 24 ч после шока (внутрисердечное введение 0,3 мл ЛС). При оценке АОК животных иммунизировали эритроцитами кролика (10⁹ клеток/свинку) [9] за 4 суток до индукции шока. Контролем служили сенсибилизированные и интактные морские свинки, не получавшие препараты и белки плазмы крови.

5-НТ измеряли в депротеинизированных образцах селезенки [13] методом ВЭЖХ на Beckman System Gold, используя детектор LC-4С, колонку SphereClone 5 μ ODS 2 (250 \times 4,60 мм) с предколонкой SecurityGuard (ODS 4 мм L \times 3,0 мм ID) (“Phenomenex”, США). Подвижная фаза — 0,1 М цитратно-фосфатный буфер, содержащий 0,3 мМ октилсульфата натрия, 0,1 мМ этилендиаминтетраацетата натрия, 8% ацетонитрила (pH 3,2) (“Sigma”, Германия). Идентификацию и количественную оценку

¹ Отдел нейрофармакологии (руководитель — член-корр. РАМН Н. С. Сапронов) НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН, Санкт-Петербург, 197376, ул. акад. Павлова, 12.

медиатора осуществляли в сравнении с внешним стандартом.

Статистическую обработку материалов проводили с использованием t-критерия Стьюдента при помощи пакета программ Statistica 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Мускариновые антагонисты, их комбинации с антихолинэстеразными препаратами или белками плазмы крови оказывали разное действие на развитие иммунологической и патохимической стадий анафилактического шока (табл. 1). Введение атропина, ипратропия или его комбинации с неостигмином, но не метадина или его комбинации с неостигмином одновременно с сенсibiliзирующей дозой ЛС приводило к снижению индекса анафилактической реакции, свидетельствуя о нарушении процесса формирования пула сенсibiliзированных лимфоцитов. Известно, что атропин и ипратропий, обладая высоким аффинитетом к пресинаптическим m_2 -AChR, способны усиливать выброс ацетилхолина волокнами *nervus vagus* [8]. Можно предположить, что избыточная концентрация ацетилхолина снижала реагинпродуцирующую активность В-лимфоцитов. Кроме того, распадаясь на фармакологически неактивные метаболиты [12], препараты, по-видимому, не влияли на передачу сигналов в ЦНС че-

рез активацию афферентных волокон *nervus vagus*, вызванную введением ЛС. Увеличение при сенсibiliзации концентрации IgG, но не альбумина, приводило к снижению индекса анафилактической реакции. Данные литературы показывают, что эффект IgG при анафилаксии связан с образованием неактивных комплексов с компонентами лошадиной сыворотки, предупреждая её потенцирующее действие на реагинпродуцирующую активность В-лимфоцитов [15].

В то же время метацин с неостигмином или атропин с галантамином предупреждали развитие патохимической стадии анафилактического шока (табл. 1). По-видимому, метацин блокирует периферические m_2 -, m_3 -AChR гладкомышечных клеток респираторного тракта. Его фармакологически активный метаболит холин [4], который, как известно [5], в качестве мускаринового и никотинового агониста усиливает активность симпатoadренальной системы, обуславливая, таким образом, протекторное действие комбинации метадина с неостигмином. Более низкая эффективность комбинации атропина с галантамином может быть связана с тем, что атропин не может полностью блокировать вызываемую галантамином активацию центральных мускариновых холинергических механизмов, приводящую, как известно, к увеличению тонической активности *nervus vagus*, усиливающей бронхokonстрикцию [11].

Полученные данные свидетельствуют, что через центральную или периферическую холинергическую систему можно инициировать противовоспалительный ответ, предупреждающий развитие анафилаксии.

Применение на патохимической стадии шока метадина с IgG оказывало антианафилактический эффект, сопоставимый с эффектом метадина в комбинации с неостигмином (табл. 1), свидетельствуя о важности блокады m -AChR и снижении системного иммунного ответа, связанного с развитием анафилаксии. Применение метадина с альбумином или с CRP, провоспалительные эффекты которого могут сопровождаться усилением выброса гистамина, в частности базофилами [2], показало, что в подобных комбинациях отменяются антианафилактогенные эффекты препарата.

Признается, что роль В-лимфоцитов в реализации анафилактических реакций не ограничивается их способностью к синтезу аллергенспецифических реагинов. Они инициируют выброс медиаторов, приводящих к нарушению сосудистой проницаемости и спазму гладкой мускулатуры [15]. Известно, что изменения в активности m - или n -AChR В-лимфоцитов, участвующих в воспалении и продуцирующих 5-НТ, влияют на синтез аллергенспецифических антител [14]. Подтверждается это тем, что купирование шоковой реакции комбинацией метадина с неостигмином или атропина с галантамином, в отличие от комбинации ипратропия с неостигмином, приводило к существенному снижению числа АОК и сопровождалось нормализацией содержания 5-НТ в селезенке (табл. 2).

Таким образом, полученные данные показывают, что холинотропными препаратами можно предупредить усиление системного иммунного ответа, связанного с активностью В-лимфоцитов селезенки, и нарушения в ней серотонинергических механизмов.

Таблица 1. Влияние холинотропных препаратов на разные стадии анафилактического шока

Препарат	Анафилактический индекс, балл	
	иммунологическая стадия ¹	патохимическая стадия ²
Контроль	4,0 ± 0,0	4,0 ± 0,0
Атропин (0,08 мг/кг)	2,0 ± 0,3***	3,7 ± 0,3
Галантамин (0,4 мг/кг)	3,6 ± 0,2	3,3 ± 0,5
Атропин (0,08 мг/кг) + галантамин (0,4 мг/кг)	2,9 ± 0,4*	1,5 ± 0,1***
Метацин (0,16 мг/кг)	3,4 ± 0,3	2,2 ± 0,1*
Ипратропий (6,2 мкг/кг)	2,2 ± 0,1***	2,3 ± 0,5*
Неостигмин (0,04 мг/кг)	3,8 ± 0,1	2,3 ± 0,2**
Метацин (0,16 мг/кг) + неостигмин (0,04 мг/кг) ³	3,4 ± 0,3	0,4 ± 0,01*
Ипратропий (6,2 мкг/кг) + неостигмин (0,04 мг/кг) ³	2,0 ± 0,2***	3,8 ± 0,4
Альбумин (500 мг/кг)	3,5 ± 0,3	1,0 ± 0,1***
IgG (1 мг/кг)	1,5 ± 0,1***	2,3 ± 0,2***
CRP (1 мг/кг) ³	2,7 ± 0,2***	2,5 ± 0,3***
Метацин (0,16 мг/кг) + альбумин (500 мг/кг) ³	2,6 ± 0,2***	4,0 ± 0,5
Метацин (0,16 мг/кг) + IgG (1 мг/кг) ³	2,9 ± 0,4*	0,5 ± 0,1***
Метацин (0,16 мг/кг) + CRP (1 мг/кг) ³	2,9 ± 0,4*	3,8 ± 0,1

Примечание. ¹ — введение препаратов вместе с сенсibiliзирующей дозой ЛС (0,1 мл подкожно); ² — введение препаратов сенсibiliзированным морским свинкам за 30 мин до индукции анафилактического шока (0,5 мл ЛС внутрисердечно); ³ — метацин или ипратропий с неостигмином вводили за 40 и 15 мин соответственно, а метацин с белками — за 30 мин до индукции шока (0,5 мл ЛС внутрисердечно). * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$, *** — $p < 0,001$ по сравнению с контролем (морскими свинками, не получавшими препараты).

Таблица 2. Влияние холинотропных препаратов на антителопродуцирующую и медиаторную активность селезенки

Препарат	АОК/10 ⁶ спленоцитов	Содержание серотонина, нг/мг белка
Негативный контроль ¹	100 ± 29	1,532 ± 0,004
Позитивный контроль	880 ± 22*	0,443 ± 0,005*
Атропин (0,08 мг/кг)	806 ± 151*	2,182 ± 0,004*. ^x
Галантамин (0,4 мг/кг)	797 ± 68*	3,385 ± 0,005*. ^x
Атропин (0,08 мг/кг) + галантамин (0,4 мг/кг)	210 ± 10 ^x	1,512 ± 0,005*. ^x
Метацин (0,16 мг/кг)	188 ± 20 ^x	1,452 ± 0,004*. ^x
Ипратропий (6,2 мкг/кг)	483 ± 12*. ^x	0,717 ± 0,005*. ^x
Неостигмин (0,04 мг/кг)	250 ± 70 ^x	1,093 ± 0,005*. ^x
Метацин (0,16 мг/кг) + неостигмин (0,04 мг/кг)	94 ± 15 ^x	0,920 ± 0,004 ^x
Ипратропий (6,2 мкг/кг) + неостигмин (0,04 мг/кг)	983 ± 97*	0,322 ± 0,005*. ^x
Альбумин (500 мг/кг)	240 ± 10*. ^x	1,234 ± 0,005*. ^x
IgG (1 мг/кг)	184 ± 45 ^x	1,422 ± 0,004*. ^x
CRP (1 мг/кг)	217 ± 13 ^x	1,410 ± 0,004*. ^x
Метацин (0,16 мг/кг) + альбумин (500 мг/кг)	900 ± 40*	1,970 ± 0,004*. ^x
Метацин (0,16 мг/кг) + IgG (1 мг/кг) ³	130 ± 14 ^x	1,091 ± 0,004*. ^x
Метацин (0,16 мг/кг) + CRP (1 мг/кг) ³	980 ± 43*	1,824 ± 0,004*. ^x

Примечание. ¹ — негативным контролем для сравнения данных по АОК являются морские свинки, иммунизированные ЭБ (1 · 10⁹ клеток на животное), а для серотонина — базальный уровень этого медиатора в селезенке; * — $p < 0,001$ по сравнению с негативным контролем; ^x — $p < 0,001$ по сравнению с позитивным контролем (сенсibilизированными животными, не получавшими препараты).

ВЫВОД

Мускариновые антагонисты или их комбинации с антихолинэстеразными средствами (атропин, ипратропий или ипратропий с неостигмином) или с белками плазмы крови (IgG) снижают сенсibilизирующее действие белкового антигена, купируют патохимическую стадию шока (атропин с галантамином, метацин с неостигмином или с IgG), С-реактивный белок острой фазы воспаления или альбумин устраняют антианафилактические эффекты метацина.

ЛИТЕРАТУРА

1. М. Д. Машковский, *Лекарственные средства*, 15-е изд., ООО “Новая Волна”, Москва (2007).
2. А. П. Пронина, П. Г. Назаров, *Цитокины и воспаление*, 7(4), 42 – 48 (2008).
3. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*, Р. У. Хабриев (ред.), 2-е изд., Москва (2005).
4. Н. С. Сапронов, Г. И. Нежинская, А. Л. Владыкин, *Мед. академ. ж.*, 9(1), 28 – 32 (2009).
5. M. Cansev, M. S. Yilmaz, Y. O. Ilcol, et al., *Eur. J. Pharmacol.*, 577(1 – 3), 129 – 142 (2007).

6. P. A. Greenberger, B. D. Rotskoff, B. Lifschultz, *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 98(3), 252 – 257 (2007).
7. C. R. Gwilt, L. E. Donnelly, D. F. Rogers, *Pharmacol. Ther.*, 115(2), 208 – 222 (2007).
8. H. Hirose, J. Jiang, M. Nishikibe, *J. Pharmacol. Sci.*, 92(3), 209 – 217 (2003).
9. N. Jerne, C. Henry, A. Nordin, et al., *Transplant. Rev.*, 18, 130 – 191 (1974).
10. K. S. Lips, A. Lührmann, T. Tschernig, et al., *Life Sci.*, 80(24), 2263 – 2269 (2007).
11. V. A. Pavlov, M. Ochani, M. Gallowitsch-Puerta, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103(13), 5219 – 5223 (2006).
12. R. D. Restrepo, *Respir. Care*, 52(7), 833 – 851 (2007).
13. H. Rogausch, T. Bock, K. H. Voigt, H. Besedovsky, *Neuroimmunomodulation*, 11(1), 58 – 64 (2004).
14. A. Schratzenholz, E. F. R. Pereira, U. Roth, et al., *Mol. Pharmacol.*, 49(1), 1 – 6 (1996).
15. R. T. Strait, S. C. Morris, F. D. Finkelman, *J. Clin. Invest.*, 116(3), 833 – 841 (2006).

Поступила 03.08.09

ANTIAPHYLACTIC EFFECTS OF MUSCARINIC ANTAGONISTS

G. I. Nezhinskaya, A. L. Vladykin, and N. S. Sapronov

Department of Neuropharmacology, Institute of Experimental Medicine, Russian Academy of Medical Sciences, ul. akademika Pavlova 12, St. Petersburg, 197376, Russia

The study was carried out on color guinea pigs, in which anaphylactic shock was induced by sensitizing and challenging doses of normal horse serum (HS). Administration of atropine, ipratropium, or ipratropium in combination with neostigmine led to reduction of sensitizing effect of HS: anaphylactic index was decreased up to (2.2 – 2.4) ± 0.1 arbitrary units (a.u.). Methacine in combination with neostigmine (0.4 ± 0.01 a.u.) or atropine in combination with galantamine (1.5 ± 0.3 a.u.) effectively prevented the pathochemical stage of anaphylactic shock. Changes in plasma protein concentrations modified effects of methacine: application of methacine with IgG was protective (0.5 ± 0.1 a.u.), while CRP abolish the antianaphylactic activity of methacine (3.8 ± 0.1 a.u.). Guinea pigs which survived shock had a great number of AFC [(880 ± 22) · 10⁶ splenocytes in experimental group and (100 ± 29) · 10⁶ in control] and low concentration of 5-HT in the spleen (at a shock, 0.443 ± 0.005; basal level, 1.532 ± 0.004 ng/mg protein). Effective prevention of anaphylactic shock resulted in normalization of B cell activity and 5-HT level in the spleen. Thus, cholinergic drugs modulate the immunological and pathochemical stages of anaphylactic shock.

Key words: B-lymphocytes, cholinergic antagonists, anticholinesterase drugs, anaphylactic shock, serotonin