

НЕЙРОНАЛЬНЫЕ ЭФФЕКТЫ МУСКАРИНОВОГО АНТАГОНИСТА В ПРОФИЛАКТИКЕ СТРЕССА

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

Оценка влияния холинергических антагонистов на модели водоиммерсионного стресса показала, что нейрональные (введение за 30 мин) и ненейрональные эффекты (введение за 14 сут) метацина (2 мг/кг), но не гексаметония (10 мг/кг), связаны с существенным снижением числа стрессовых язв. При эффективной профилактике антителогенез спленоцитов и концентрация кортикостерона в сыворотке крови приближаются к базальному уровню, а при неэффективной — увеличивается уровень функциональной активности В-лимфоцитов и синтез глюкокортикоидов.

Ключевые слова: В-лимфоциты, ненейрональные эффекты холинергических антагонистов, стрессовые язвы, кортикостерон

ВВЕДЕНИЕ

Нейрональные эффекты антагонистов мускариновых рецепторов (атропин, метацин) обычно рассматривают в связи с их антисекреторным действием [6]. Однако известно, что холинергические антагонисты проявляют ненейрональные эффекты, в частности, изменяют функции м- и н-холинорецепторов (m-, n-AchR) В-лимфоцитов, в том числе антителопродуцирующую активность [3, 13]. Экспериментально показана возможность применения оценки уровня антителогенеза для прогноза эффективности профилактики стрессорных расстройств [1]. На моделях первичного иммунного ответа у мышей линий C57BL/6, CBA, (C57BL/6 · CBA)F1 (низких, средних, высокоиммунных) показана динамика антителогенеза в лимфоидных органах (селезенка, лимфатические узлы), вызванного холинергическими препаратами (метацин, гексаметоний, неостигмин, комбинации метацина или гексаметония с неостигмином), а на модели водоиммерсионного стресса (ВИС), являющейся моделью стрессовых язв, — возможность иммунопрофилактики этими препаратами [5]. Однако постстрессорный уровень антителогенеза и глюкокортикоидов остается неизученным, хотя известно, что увеличение синтеза глюкокортикоидов при стрессе приводит к деформации Т-клеточных реакций иммунитета, сопровождающейся компенсаторным переключением иммунных реакций на В-клеточный тип ответа [9]. Протекторная роль В-клеточного иммунитета в усилении эффекта антигипоксантов была показана на моделях гипоксической гипоксии [2] и ВИС [4]. Наиболее значимые эффекты (удлинение продолжительности жизни мышей и снижение числа стрессовых язв) проявлялись при применении стимулятора В-лимфоцитов повиаргола за 5 или 14 сут, а антигипоксанта — за 30 мин до воздействия. В этих условиях появлялась возможность

снижения доз антигипоксантов. Неэффективность применения только стимулятора В-лимфоцитов, по-видимому, связана с их активностью, которая, как известно, приводит к апоптозу CD4⁺ Т-лимфоцитов [15]. Исходя из изложенного, можно предположить, что локальный и системный иммунный ответ, регулируемый глюкокортикоидами, влияют на патогенез образования стрессовых язв.

Целью работы являлось изучение стресс-лимитирующей роли иммунной реакции, вызванной холинергическими антагонистами, и их влияния на динамику антителообразования спленоцитов и уровень кортикостерона в сыворотке крови крыс.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на крысах-самцах линии Вистар ($n = 180$) массой 180 – 200 г, полученных из питомника Рапполово РАМН. Животных содержали в условиях вивария при температуре 23 °С и 12-часовом световом дне. Мускариновый антагонист метацин применяли в дозе 2 мг/кг, никотиновый антагонист гексаметоний (бензогексоний) — 10 мг/кг. ВИС модулировали у крыс, находящихся в течение 24 ч на голодной диете со свободным доступом к воде, помещая их в специальные проволочные пеналы и погружая на 7 ч в воду (при 23 °С) до уровня мечевидного отростка. После ВИС у крыс под эфирным наркозом извлекали желудки и оценивали степень поражения слизистой оболочки [14]. Нейрональные эффекты холинергических антагонистов в профилактике ВИС изучали при введении препаратов за 5 и 14 сут до ВИС, а эффекты, связанные и их влиянием на холинергическую иннервацию — при введении препаратов за 30 мин до ВИС. Контролем служили крысы, которым в эти сроки инъектировали физиологический раствор. О защитном эффекте препаратов судили по наличию язв на слизистой оболочке желудка опытных и контрольных крыс.

Количество антителообразующих клеток (АОК на 10⁶ спленоцитов) [12] исследовали в сроки 0, 5, 14, 21 и 28 сут у крыс, которых иммунизировали эритроцита-

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

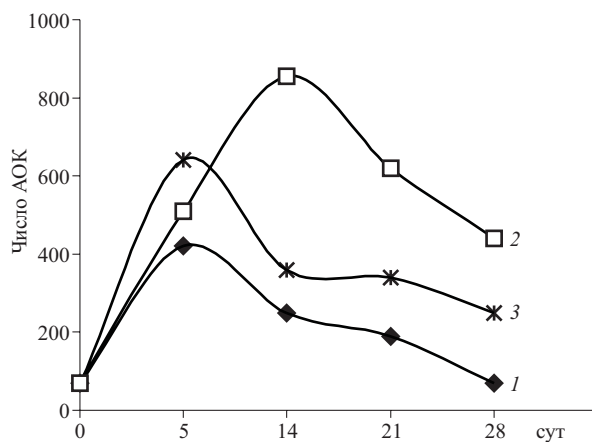
ми барана ($1 \cdot 10^7$ клеток/крыса) и одновременно вводили им препараты. Количество АОК определяли также у крыс после ВИС. Контролем служили крысы, иммунизированные эритроцитами барана и получившие физиологический раствор. Концентрацию кортикостерона в сыворотке крови крыс определяли иммуноферментным методом [8] с использованием набора реагентов СтероидИФА-кортикостерон (ЗФО “Вектор-Бест”, Новосибирск) на 5-е и 14-е сутки после введения холинергических антагонистов, а также — через 2, 6, 24 ч после ВИС.

Результаты представлены в виде значений величины \pm SEM. Статистическую обработку материалов проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование ненейрональных эффектов мускаринового (метацин) и никотинового (гексаметоний) антагонистов, связанных с их влиянием на иммунную систему, показало, что, вводя их за 5 суток до ВИС, можно достичь несущественного снижения числа стрессовых язв. Однако применение метацина, но не гексаметония, за 14 сут до ВИС предотвращало образование стрессовых язв ($n = 10$) (таблица), которое сопровождалось снижением числа АОК (100 ± 17 на 10^6 спленоцитов) и концентрации кортикостерона в сыворотке крови (112 ± 4 нг/мл) до базального уровня. В отличие от метацина, введение гексаметония за 14 сут до ВИС приводило к увеличению числа АОК (870 ± 21 на 10^6 спленоцитов, $p < 0,001$) и продукции глюкокортикоида (350 ± 4 нг/мл, $p < 0,001$), сопоставимому с уровнем этих показателей при стрессе. Измерение кортикостерона через 6 и 24 ч после ВИС показало, что базальный уровень показателей определялся у крыс, получивших метацин, а повышенный — у крыс, получивших гексаметоний. Таким образом, имея представление о влиянии препарата на системный иммунный ответ, можно прогнозировать эффективность профилактики стресса. Данные, полученные на модели первичного иммунного ответа (иммунизация эритроцитами барана) свидетельствуют, что гексаметоний вызывает усиление антителогенеза спленоцитов при локальном ($p < 0,001$, $n = 10$), а метацин — при системном иммунном ответе ($p < 0,001$, $n = 10$). Кроме того, препараты иммунологически активны в течение 28 сут и более (рисунок). При оценке концентрации кортикостерона в сыворотке крови в сроки индуктивной и продуктивной фазы иммунного ответа обнаружено, что эти показатели незначительно отличаются от базального уровня (в опыте $110 - 120 \pm 5$ нг/мл, в контроле — 107 ± 6 нг/мл).

Сопоставление нейрональных и ненейрональных эффектов метацина выявило идентичность результатов: существенное снижение язвенных повреждений в желудке по сравнению с контролем (таблица). По-видимому, снижение образования стрессовых язв при



Динамика антителогенеза спленоцитов крыс после введения препаратов.

Крыс иммунизировали эритроцитами барана и одновременно вводили им в контроле (1) физиологический раствор, в опыте — метацин (2) или гексаметоний (3). Количество АОК (на 10^6 спленоцитов) определяли в сроки 0 (базальный уровень), 5, 14, 21 и 28 сут.

воздействии ВИС на стадии системного иммунного ответа, вызванного метацином, связано с устранением дисбаланса в гормональной и иммунной системах. Известно, что нарушение функций иммунной и гормональной систем является следствием стресса, приводящего на стадии локального ответа к секвестрации $CD4^+$ Т-лимфоцитов в костном мозге [11], апоптозу, индуцируемому полиреактивными В-лимфоцитами [7], усилению протекторного действия глюкокортикоидов на образование стрессовых язв [10]. Можно также предположить, что эффекты метацина, связанные с блокадой им m-AchR элементов холинергической иннервации желудка крыс (введение метацина за 30 мин до ВИС), приводят к снижению его моторной и секреторной функции, нивелируя таким образом повреждающее воздействие ВИС. Косвенно это подтверждается

Уровень деструкции слизистой оболочки желудка при профилактике водоиммерсионного стресса холинергическими антагонистами

Препарат	Введение препаратов перед водоиммерсионным стрессом *		
	за 30 мин	за 5 дней	за 14 дней
Контроль	$3,2 \pm 0,2$	$3,3 \pm 0,4$	$3,3 \pm 0,2$
Метацин, 2 мг/кг	$1,3 \pm 0,2^{***}$	$2,2 \pm 0,1^{**}$	$1,0 \pm 0,1^{***}$
Гексаметоний, 10 мг/кг	$3,2 \pm 0,4$	$2,1 \pm 0,3^{**}$	$3,1 \pm 0,1$

Примечание. * — нейрональные эффекты препаратов изучали при их введении за 30 мин, а ненейрональные — за 5 и 14 сут до стресса. Степень поражения слизистой оболочки оценивали в баллах [14]: 0 — нет поражения; 1 — 1–3 пунктирных поражения; 2 — более трех пунктирных поражений или одно длинное поражение (4 мм и более); 3 — одно большое поражение или много пунктирных поражений; 4 — 3–4 длинных поражения; 5 — много длинных поражений. ** — $p < 0,05$, *** — $p < 0,001$.

известными фактами о применении *m*-холиноблокаторов при язвенной болезни [6].

Таким образом, полученные данные показывают, что оценка антителообразующей активности В-лимфоцитов, пики которой проявляются на 5-е (гексаметоний) и 14-е сутки (метацин), позволяет прогнозировать ненейрональные эффекты антагонистов *m*- и *n*-AChR, учитывая которые можно влиять на иммунологическое звено патогенеза стрессовых язв. Оценка концентрации кортикостерона в сыворотке крови позволяет судить об эффективности проведенной профилактики.

ВЫВОД

В профилактике водоиммерсионного стресса ненейрональные и нейрональные эффекты мускаринового антагониста метацина, связанные с активацией В-лимфоцитов или блокадой *m*-холинорецепторов желудка, лимитируют ишемические повреждения слизистой желудка, что может являться важным компонентом в терапии и профилактике “стрессовых язв”, маркерами чему могут служить антителопродуцирующая функция В-лимфоцитов и уровень глюкокортикоидов в сыворотке крови.

ЛИТЕРАТУРА

1. Г. И. Нежинская, Н. С. Сапронов, *Пат. физиол. и экспер. терапия*, № 3, 22 – 25 (2002).
2. Г. И. Нежинская, П. Г. Назаров, Н. Н. Петрова и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **66**(6), 42 – 44 (2003).
3. Г. И. Нежинская, Н. А. Лосев, Н. С. Сапронов, *Экспер. и клин. фармакол.*, **69**(6), 63 – 67 (2006).
4. Г. И. Нежинская, Н. Н. Петрова, *Цитокины и воспаление*, **5**(1), 34 – 36 (2006).
5. Г. И. Нежинская, Н. А. Лосев, Н. С. Сапронов, *Пат. физиол. и экспер. терапия*, № 2, 12 – 13 (2007).
6. Д. А. Харкевич, *Фармакология, ГЭОТАР, Медицина*, Москва (2003).
7. Z. J. Chen, F. Shimizu, J. Wheeler, et al., *Eur. J. Immunol.*, **26**, 2916 – 2923 (1996).
8. J. R. Crowther (ed.), *The ELISA Guidebook*, Humana Press, Totowa, NJ (2000).
9. I. J. Elenkov and G. P. Chrousos, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **966**, 290 – 303 (2002).
10. L. P. Filaretova, A. A. Filaretov, and G. B. Makara, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **274**, G1024 – 1030 (1998).
11. A. Hassig, L. Wen-Xi, and K. Strampfli, *Medical Hypothesis*, **46**(6), 551 – 555 (1996).
12. N. Jerne, C. Henry, A. Nordin, et al., *Transplant. Rev.*, **18**, 130 – 191 (1974).
13. K. Kawashima and T. Fujii, *Life Sci.*, **74**, 6675 – 6696 (2003).
14. M. Leitold, W. Fleissig, and A. Merk, *Arzneimittelforschung*, **34**(4), 468 – 473 (1984).
15. E. V. Sidorova, L. Li-Sheng, B. Devlin, et al., *Immunol. Lett.*, **88**(1), 37 – 42 (2003).

Поступила 27.09.07

NON-NEURONAL EFFECTS OF MUSCARINIC ANTAGONISTS IN STRESS PROPHYLAXIS

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

We have studied the stress-limiting role of the immune reaction initiated by cholinergic antagonists and the influence of these drugs on the dynamics of antibody formation in the spleen and the blood serum corticosterone level. The protective effect of immune reaction initiated by methacine (muscarinic receptor antagonist) or hexamethonium (nicotinic receptor antagonist) in prevention of stress gastric ulcer in rats (induced by water immersion stress, WIS) was estimated upon administration of the drugs for 5 days (local response) or 14 days (systemic response) prior to WIS. The pharmacological effects of drugs were estimated upon their administration 30 minutes prior to WIS. It is shown that, if cholinergic antagonists affect the systemic immune response the induction of WIS at this level of immune reaction leads to the effective prevention of stress gastric ulcer. The administration of methacine (but not hexamethonium) 14 days prior to WIS effectively reduces gastric lesions up to 1.0 ± 0.1 arbitrary units in comparison to 3.6 ± 0.2 arbitrary units in the control group. Under effective prophylaxis, the number of antibody-forming cells (AFC/ 10^6 of splenocytes) and corticosterone concentration are close to their basal level, while under stress conditions, these parameters significantly increase up to 870 ± 21 and 350 ± 4 vs. 100 ± 17 and 107 ± 6 in the control group, accordingly. It is established that both methacine and hexamethonium remain immunologically active for 28 days and more: the maximum amount of AFC upon administration of hexamethonium and methacine was on the 5th day and 14th day, respectively. Thus, determination of the drug influence on the systemic immune response allows one to predict the non-neuronal effects of cholinergic antagonists and, in this way, to affect the pathogenesis of stress gastric ulcer. Estimation of the AFC response and corticosterone level after WIS shows the efficacy of prophylaxis of the gastric stress lesion.