

ВЛИЯНИЕ АЦЕТИЛХОЛИНА И С-РЕАКТИВНОГО БЕЛКА НА РЕГУЛЯЦИЮ АНАФИЛАКТИЧЕСКОГО ШОКА У МОРСКИХ СВИНОК

Г. И. Нежинская, Н. А. Лосев, П. Г. Назаров, Н. С. Сапронов¹

Изучение ацетилхолинзависимой регуляции анафилактического шока показало, что увеличение концентрации эндогенного ацетилхолина при сенсibilизации приводит к удлинению агонального периода шока (в опыте — $15 \pm 0,1$ мин, в контроле — $3 \pm 0,1$ мин), а на патохимической стадии — купирует шок (анафилактический индекс в опыте — $0,4 \pm 0,02$, в контроле — $4 \pm 0,02$). Введение очищенных белков плазмы крови (IgG и CRP) снижает анафилактическую реакцию. Рефрактерность, возникшая после их введения, уменьшает ответ на повторные введения разрешающей дозы лошадиной сыворотки, но не снижает ответ на повторное введение сенсibilизирующей дозы лошадиной сыворотки. В сочетании с метацином белки по-разному влияют на шок: IgG потенцирует бронхолитическое действие метацина, а CRP — отменяет его. Эффективная терапия шока приводит к нормализации антителопродуцирующей активности В-лимфоцитов, в отличие от незащищенных свинок, перенесших шок, у которых определяется высокий уровень антителогенеза.

Ключевые слова: анафилактический шок, ацетилхолин, С-реактивный белок, IgG, В-лимфоциты

ВВЕДЕНИЕ

При обсуждении механизма купирования иммунологической и патохимической стадий анафилактического шока обычно не учитывается возможная роль холинэргической системы и белков плазмы крови, способных взаимодействовать с нейромедиаторами, в развитии гиперчувствительности немедленного типа. Сенсibilизация вначале на местном, а затем на системном уровнях подразумевает выработку аллерген-специфических антител класса IgE- или IgG1 и их связывание со специфическими Fc-рецепторами тканевых тучных клеток и циркулирующих базофилов крови. Продукция В-лимфоцитами реагинов зависит от презентации аллергена антигенпрезентирующими клетками и кооперации В-лимфоцитов с Т-хелперами 2-го типа [14]. Патохимическая стадия, как результат взаимодействия реагинов с аллергеном на поверхности клеток-эффекторов, характеризуется увеличением внутриклеточной концентрации несвязанного Ca^{2+} , что приводит к интенсивному выбросу вазоактивных аминов и активации компонентов кининовой системы [7].

В то же время очевидно, что парасимпатическая нервная система является одним из механизмов регуляции возбудимости клеток эффекторных тканей при анафилактическом шоке [1] и способна контролировать активность лейкоцитов, в том числе тучных клеток [4, 11], В-клеток [8, 12]. Бронхолитический эффект холиноблокаторов при анафилаксии объясняют блокадой м-холинорецепторов гладкомышечных кле-

ток [7] и, возможно, блокадой м-холинорецепторов на тучных клетках [4], в результате чего снижается чувствительность клеток-эффекторов к комплексам IgE- или IgG1-антител с аллергеном. Кроме того, увеличение концентрации эндогенного ацетилхолина может привести к возбуждению м-холинорецепторов эндотелия и к расширению сосудов [7]. Вместе с тем у лиц с повышенной концентрацией С-реактивного белка (CRP) снижается реакция эндотелия на ацетилхолин и уменьшается вызываемая им вазодилатация [9, 13]. Эти данные, а также полученные нами ранее результаты, показавшие роль CRP и IgG в развитии патохимической стадии шока [3], указывают на участие ацетилхолина и белков плазмы крови в регуляции гиперчувствительности немедленного типа, но их роль в регуляции иммунологической стадии шока остается мало изученной.

В настоящей работе на модели анафилактического шока у морских свинок исследованы эффекты холинэргических веществ и белков плазмы крови (CRP и IgG) на иммунологической и патохимической стадиях шока.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на 150 самцах морских свинок массой 320 – 370 г. Анафилактический шок вызывали у свинок, предварительно (за 2 недели) сенсibilизированных подкожным введением 0,1 мл нормальной лошадиной сыворотки (НПО “Аллерген”, Ставрополь), внутрисердечным введением разрешающей дозы сыворотки (0,3 – 0,5 мл). Тяжесть шока оценивали по анафилактическому индексу [5].

При сенсibilизации очищенный CRP человека (ICN, США) и белок сравнения – нормальный донор-

¹ Отдел нейрофармакологии (руководитель — член-корр. РАМН Н. С. Сапронов) и лаборатория общей иммунологии (руководитель — проф. П. Г. Назаров) ГУ НИИ экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург, 197376, ул. акад. Павлова, 12.

ский гаммаглобулин (IgG) (НИИЭМ им. Пастера, Санкт-Петербург) в дозах 1 мг/кг (группы № 1 и 2), а также препараты м-холиноблокатор метацин (2 мг/кг) и ингибитор ацетилхолинэстеразы неостигмин (прозерин) 0,02 мг/кг (группы № 3 и 4) вводили внутривенно (растворитель — вода для инъекций) одновременно с сенсibiliзирующей дозой лошадиной сыворотки. Комбинации препаратов вводили по схеме: метацин (2 мг/кг) — за 40 мин, неостигмин (0,02 мг/кг) — за 15 мин (группа № 5), а метацин и CRP или IgG вводили одновременно за 40 мин до подкожной инъекции лошадиной сыворотки (группы № 6 и 7).

При индукции шока (0,5 мл лошадиной сыворотки, внутрисердечно) CRP или IgG (группы № 8 и 9), метацин или неостигмин (группы № 10 и 11) вводили за 30 мин до шока. Метацин в комбинации с неостигмином вводили за 40 и 15 мин соответственно (группа № 12), метацин в комбинации с CRP или IgG — за 40 мин (группы № 13 и 14) до инъекции разрешающей дозы лошадиной сыворотки. В группах контроля животные при сенсibiliзации и перед инъекцией разрешающей дозы лошадиной сыворотки получали физиологический раствор. Каждая группа включала 10 животных.

Через 2 нед после пережитого шока части морских свинок, получивших при сенсibiliзации препарат IgG, вновь вводили разрешающую дозу сыворотки. Другая часть свинок содержалась в условиях вивария в течение 30 сут, после чего их вновь сенсibiliзировали подкожным введением лошадиной сыворотки, и на 14-е сутки индуцировали анафилактический шок.

Таблица 1. Влияние холинэргических средств и белков плазмы крови на анафилактический шок у морских свинок

Препарат	Анафилактический индекс (баллы) при введении препаратов на стадиях шока	
	Иммунологическая стадия	Патохимическая стадия
Контроль (0,9 % NaCl)	4 ± 0,0	4 ± 0,0
IgG (1 мг/кг)	1,5 ± 0,1**	2,3 ± 0,2**, #
CRP (1 мг/кг)	2,7 ± 0,2**, ×	2,5 ± 0,3**
Метацин (2 мг/кг)	3,4 ± 0,3	2,3 ± 0,2**, #
Неостигмин (0,02 мг/кг)	3,8 ± 0,1	2,8 ± 0,2**, #
Метацин (2 мг/кг) + неостигмин (0,02 мг/кг)	4 ± 0,0	0,4 ± 0,02**, ##
Метацин (2 мг/кг) + CRP (1 мг/кг)	3 ± 0,4*	3,8 ± 0,1
Метацин (2 мг/кг) + IgG (1 мг/кг)	2,6 ± 0,5*	0,5 ± 0,1**, ##

Примечание. Иммунологическая стадия — введение препаратов и сенсibiliзирующей дозы нормальной лошадиной сыворотки (0,1 мл, подкожно). Патохимическая стадия — введение препаратов сенсibiliзированным свинкам перед введением разрешающей дозы лошадиной сыворотки. Отличия достоверны по сравнению: * ** — с контролем ($p < 0,05$; $0,001$); × — между IgG и CRP ($p < 0,001$); #, ## — между иммунологической и патохимической стадиями шока ($p < 0,01 - 0,001$)

Контролем служили сенсibiliзированные животные, у которых индуцировали шок внутрисердечным введением того же объема разрешающей дозы сыворотки.

Количество антителообразующих клеток (АОК) в селезенке [2] оценивали через 24 ч после перенесенного шока. Иммунизацию эритроцитами барана (ЭБ; 10^9 клеток/свинку) проводили за 4 сут до индукции шока. В опыт брали сенсibiliзированных морских свинок, защищенных перед индукцией шока IgG или CRP, метацином в сочетании с IgG или CRP, метацином или неостигмином, метацином в комбинации с неостигмином. Контролем служили сенсibiliзированные и незащищенные свинки, получившие внутрисердечно 0,3 мл лошадиной сыворотки (позитивный контроль), и интактные животные (негативный контроль). Животных умерщвляли воздушной эмболией.

Статистическую обработку материалов проводили с использованием t -критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Применение холинэргических препаратов и очищенных белков плазмы крови (CRP и IgG) при анафилактическом шоке показало, что уровень десенсibiliзации можно регулировать на иммунологической и патохимической стадиях шока (табл. 1).

Введение CRP или IgG одновременно с сенсibiliзирующей дозой лошадиной сыворотки (иммунологическая стадия), по сравнению с группой животных, получавших метацин в комбинации с неостигмином, и с контрольной группой (животные, не получавшие при сенсibiliзации препараты), приводит к снижению анафилактической реакции ($n = 10$, $p < 0,001$). Антианафилатогенный эффект у IgG более выражен по сравнению таковым у CRP ($n = 10$, $p < 0,001$). Можно предположить, что введение белков плазмы крови IgG или CRP совместно с лошадиной сывороткой (ЛС) при сенсibiliзации предупреждает в той или иной степени активацию реакин-продуцирующих В-клеток антигенами лошадиной сыворотки. Применение IgG или CRP за 30 мин до шока (табл. 1) также предупреждает развитие отека ($n = 10$, $p < 0,001$). Известно, что инициация патохимической стадии шока связана с образованием иммунных комплексов типа [ЛС-реакин] на поверхности тучных клеток, ведущих к поперечным сшивкам Fcε-рецепторов [реакин-ЛС-реакин] и вызывающим дегрануляцию [6]. Не исключена возможность образования неактивных комплексов IgG и CRP с Fcγ-рецепторами тучных клеток, препятствующих поперечным сшивкам рецепторов аллергеном, и блокирующих их дегрануляцию. Возможность подобного механизма косвенно подтверждается клиническими данными: у больных с острыми аллергическими реакциями при повышенном уровне CRP обнаруживается низкая концентрация гистамина в плазме [10]. Рефрактерность, возникшая после введения белков плазмы крови, уменьшала анафилактический ответ на повтор-

ные введения (через две недели) разрешающей дозы лошадиной сыворотки (табл. 2), что, по-видимому, связано со снижением реактин-продуцирующей активности В-клеток, возникшей на этапе сенсибилизации. Данные предположения требуют дальнейшего детального уточнения. В то же время подобная рефрактерность не отменяет анафилактического ответа на введение антигена. Повторная сенсибилизация лошадиной сывороткой (через 30 сут) животных, защищенных IgG, и введение разрешающей дозы сыворотки (через 14 сут) приводили к развитию анафилаксии, интенсивность которой не отличалась от контроля ($4 \pm 0,0$ балла, $n = 6, p > 0,5$).

Введение холинергических препаратов (метацин за 40 мин, неостигмин за 15 мин) с сенсибилизирующей дозой лошадиной сыворотки характеризуется удлинением агонального периода шока (в опыте $15 \pm 0,1$, в контроле — $3 \pm 0,1$ мин; $n = 10, p < 0,001$). Применение этой схемы перед индукцией приводило к купированию анафилактической реакции (табл. 1). Полученные данные показывают, что холинергические препараты практически не оказывают никакого влияния на иммунологическую стадию шока, но они эффективны на патохимической стадии шока. Схема применения метацина (за 40 мин) в комбинации с неостигмином (за 15 мин) рассчитана на то, чтобы блокировать м-холинорецепторы тучных клеток и выброс ими гистамина [6], а избыток свободного ацетилхолина, образующийся при подавлении ацетилхолинэстеразы, мог непосредственно стимулировать н-холинорецепторы В-клеток, в результате чего снижается их активность [12].

Введение метацина с IgG (за 40 мин до шока) оказывает антианафилактический эффект (табл. 1), сравнимый с эффектом комбинации метацина с неостигми-

ном, а введение метацина с CRP — снижает бронхолитический эффект метацина (табл. 1). На основании ранее полученных нами данных [3] можно предположить, что роль CRP как возможного “холинолитика” сводится к ингибированию ацетилхолина в кровяном русле и снижению возбуждения м-холинорецепторов эндотелия сосудов. У сенсибилизированных свинок, получивших метацин в комбинации с неостигмином или метацин одновременно с препаратом IgG (табл. 3), активность В-клеток в селезенке сопоставима с контролем (интактные свинки). У сенсибилизированных и переживших шок свинок (получивших внутрисердечно 0,3 мл разрешающей дозы сыворотки) определяется большое количество АОК, существенно превышающее число АОК у контрольных животных ($p < 0,001, n = 10$).

Таким образом, полученные данные могут свидетельствовать о том, что холинергическими препаратами, увеличивающими концентрацию эндогенного ацетилхолина, можно предупредить патохимическую стадию анафилактического шока. Белки плазмы IgG и CRP оказывают десенсибилизирующее действие и снижают анафилактическую реакцию.

ВЫВОДЫ

1. На модели анафилактического шока введение препаратов гаммаглобулина или С-реактивного белка может регулировать иммунологическую и патохимическую стадии шока, а холинергические препараты (метацин за 40 мин, неостигмин за 15 мин до шока) — купируют шок.

2. На эффективность метацина оказывают влияние белки плазмы крови: гаммаглобулин усиливает брон-

Таблица 2. Анафилактический индекс у морских свинок, получивших при сенсибилизации препараты и переживших шок, после повторного введения им разрешающей дозы лошадиной сыворотки

Препарат	Анафилактический индекс	% выживших животных
Контроль (0,9 % NaCl)	$4 \pm 0,0$	0
IgG (1 мг/кг)	$2 \pm 0,1^{1*}$	100
	$2 \pm 0,1^{2*}$	100
	$2 \pm 0,1^{3*}$	100
CRP (1 мг/кг)	$1 \pm 0,1^{1*}$	100
	$4 \pm 0,0^2$	0
Метацин (2 мг/кг) + CRP (1 мг/кг)	$4 \pm 0,0$	0
Метацин (2 мг/кг) + IgG (1 мг/кг)	$3,4 \pm 0,5$	30

Примечание. Повторную разрешающую дозу лошадиной сыворотки вводили через две недели после её предыдущей инъекции; ^{1,2,3} — результаты второго и последующих введений разрешающей дозы лошадиной сыворотки; * — достоверность отличий по сравнению с контролем ($p < 0,001$).

Таблица 3. Число АОК в селезенке морских свинок, перенесших анафилактический шок

Группа животных	АОК/10 ⁶ спленоцитов
Интактные, иммунизированные ЭБ (негативный контроль)	100 ± 29
Сенсибилизированные, незащищенные свинки (позитивный контроль) [#]	$880 \pm 22^*$
Сенсибилизированные свинки, IgG (1 мг/кг)	198 ± 50
Сенсибилизированные свинки, CRP (1 мг/кг)	205 ± 62
Сенсибилизированные свинки, метацин (2 мг/кг)	188 ± 44
Сенсибилизированные свинки, неостигмин (0,02 мг/кг)	250 ± 70
Сенсибилизированные свинки, метацин (2 мг/кг) + неостигмин (0,02 мг/кг)	$90 \pm 15^*$
Сенсибилизированные свинки, метацин (2 мг/кг) + IgG (1 мг/кг)	$104 \pm 10^*$

Примечание. [#] — сенсибилизированные свинки получили внутрисердечно разрешающую дозу лошадиной сыворотки — 0,3 мл. Различия достоверны по сравнению: * — $p < 0,001$ с негативным контролем; ^{*} — между сенсибилизированными незащищенными и защищенными морскими свинками

холитическое действие метацина, а С-реактивный белок — отменяет его; защита от шока приводит к нормализации антителообразующей активности В-лимфоцитов, которая увеличена у незащищенных животных, перенесших шок.

ЛИТЕРАТУРА

1. И. С. Гушин, *Иммунология*, № 4, 8 – 9 (1994).
2. В. М. Евстропов, И. Н. Силич, *Иммунология*, № 6, 37 – 40 (1988).
3. Г. И. Нежинская, П. Г. Назаров, Н. Р. Евдокимова и др., *Цитокины и воспаление*, № 1, 44 – 48 (2004).
4. П. В. Сергеев, Н. К. Шимановский, В. И. Петров, *Рецепторы физиологически активных веществ*, Москва-Волгоград (1999).
5. *Руководящие методические материалы по экспериментальному и клиническому изучению новых лекарственных средств*, Москва, ФК, Часть 6 (1986), сс. 165 – 178.
6. Дж. К. Формен, *Руководство по иммунофармакологии*, М. М. Дейл, Дж. К. Формен (ред.), Медицина, Москва (1998), сс. 16 – 31.
7. Д. А. Харкевич, *Фармакология*, ГЭОТАР, Медицина, Москва (2003).
8. J. K. Booker and G. Haughton, *Int. Immunol.*, **6**(9), 1427 – 1436 (1994).
9. S. Fichtlscherer, G. Rosenberg, D. H. Walter, et al., *Circulation*, **102**(9), 1000 – 1006 (2000).
10. R. Y. Lin, M. R. Trivino, A. Curry, et al., *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, **87**(5), 412 – 416 (2001).
11. G. C. Mudde, I. G. Reischul, N. Corvaia, et al., *Immunol., Cell Biol.*, **74**(2), 167 – 173 (1996).
12. K. Z. Sato, T. Fujii, Y. Watanabe, et al., *Neurosci. Lett.*, **266**(1), 17 – 20 (1999).
13. J. Sinisalo, J. Paronen, K. J. Mattila, et al., *Atherosclerosis*, **149**(2), 403 – 411 (2000).
14. D. T. Umetsu and R. H. DeKruyff, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **215**(1), 11 – 20 (1997).

Поступила 16.11.04.

EFFECT OF ACETYLCHOLINE AND C-REACTIVE PROTEIN ON REGULATION OF ANAPHYLACTIC SHOCK IN GUINEA PIGS

G. I. Nezhinskaya, N. A. Losev, P. G. Nazarov and N. S. Saprionov

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

The investigation of acetylcholine-dependent regulation of the model anaphylactic shock in guinea pigs showed that an increase in the concentration of endogenous acetylcholine in sensitized animals leads to an increase in the agonal shock period (by 15 ± 1 min in the test and 3 ± 1 min in the control) and abolishes shock in the pathochemical phase: anaphylactic index 0.4 ± 0.02 in the test against 4 ± 0.02 in the control). The injection of purified blood plasma proteins – IgG or C-reactive protein (CRP) preparations – decreased the anaphylactic reaction. The activation of cholinergic tone prior to shock induction is an effective means of preventing shock development. The acquired resistance decreased the response to repeated injections of horse serum. Animals protected from the shock (methacin 40 min and neostigmine 15 min prior to shock, or methacine plus IgG 40 min prior to shock) showed nearly normal PFCs. The effect of methacin was significantly influenced by simultaneously injected plasma proteins: IgG potentiated the broncholytic effect of methacin, while CRP abrogated it. The effective antishock therapy led to normalization of the antibody production activity of B-lymphocytes, while unprotected animals exhibited increased level of antibody production.