

РАЗНЫЕ АСПЕКТЫ

ВЛИЯНИЕ ГАЛАНТАМИНА И ТЕСТОСТЕРОНА НА АРТРИТНУЮ РЕАКЦИЮ И СОДЕРЖАНИЕ ДОФАМИНА В СЕЛЕЗЕНКЕ КРЫС

Г. И. Нежинская, Н. С. Сапронов, Н. Р. Евдокимова, П. Д. Шабанов¹

На модели гипо/гиперандрогенных крыс с адьювантным артритом показано, что при дефиците тестостерона галантамин или заместительная терапия тестостероном (введение в течение 10 сут после гонадэктомии) приводили к замедлению появления язв на голеностопных суставах. Кроме того, галантамин снижал отеки (мм) голеностопных суставов (галантамин — $8,6 \pm 0,2$, тестостерон — $10,5 \pm 0,2$; $p < 0,01$, $n = 12$) и индуцировал повышение концентрации дофамина в селезенке. Введение галантамина на фоне гиперандрогении не снижало артритную реакцию, что, видимо, связано с функциональным дисбалансом между холинергической и гормональной системами.

Ключевые слова: селезенка; адьювантный артрит; галантамин; тестостерон; дофамин; крысы

ВВЕДЕНИЕ

Холинергическая система модулирует локальный и системный воспалительный ответ при аутоиммунных состояниях [1, 3]. Известно, что В-лимфоциты при ревматоидном артрите попадают в синовиальную жидкость [16] и что лимфоциты способны синтезировать ацетилхолин [7]. Кроме того, ацетилхолин синтезируется в синовиальной жидкости больных ревматоидным артритом [14]. Все это позволяет предположить, что экстраинаптический ацетилхолин (ненейрональная холинергическая система) может оказывать противовоспалительные эффекты, и, возможно, низкий уровень ацетилхолина является препятствием для предупреждения артрита.

Помимо холинергической системы, в контроле работы иммунитета принимает участие и адренергическая система. В частности, дофамин [10], синтезируемый лимфоцитами, регулирует функциональную активность этих клеток, взаимодействуя с обоими подтипами своих рецепторов (D1 и D2) на их поверхности. Вместе с тем показано, что активация рецепторов дофамина на лимфоцитах сопровождается каскадом патогенетических реакций при артритах [11]. Однако при артритах практически не изучено состояние дофаминергической системы в иммунных органах, в частности в селезенке.

Хорошо известно, что тестостерон способен тормозить развитие адьювантного артрита [6]. Однако увеличение концентрации свободного дофамина происходит только у гонадэктомированных животных [17].

Поэтому исследование взаимодействия холинергических и дофаминергических систем при развитии артрита на фоне гипо/гиперандрогенных состояний актуально и обусловлено поиском новых путей профилактики заболевания.

Целью работы явилось изучение влияния галантамина и тестостерона на артритную реакцию и содержание дофамина в селезенке крыс с гипо/гиперандрогенным статусом.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты проведены на крысах-самцах линии Вистар массой 180–200 г ($n = 96$), полученных из ФГУП “Питомник лабораторных животных “Рапполово” РАМН. Крыс содержали в условиях вивария на стандартном рационе со свободным доступом к воде при температуре 22–23 °С и 12-световом режиме. Крыс разделили на 2 группы: интактные животные и крысы, которым провели двустороннюю гонадэктомию под эфирным наркозом. Для фармакологического анализа использовали тестостерона пропионат (5 мг/кг, Ростов-на-Дону, Россия) и антихолинэстеразный препарат галантамина гидробромид (1 мг/кг, “Sigma”), которые вводили в течение 10 сут (одна инъекция в сутки) внутривенно. Выделяли группы оперированных животных ($n = 12$ в каждой из групп): 1 — крысы, получавшие 0,9 % раствор NaCl (контроль); 2 — интактные крысы, получавшие галантамин; 3 — интактные крысы, получавшие тестостерон; 4 — интактные крысы, получавшие галантамин + тестостерон; 5 группа — гонадэктомированные крысы, не получавшие препараты; 6 — гонадэктомированные крысы, получавшие галантамин; 7 — гонадэктомированные крысы, получавшие тестостерон; 8 — гонадэктомированные крысы, получавшие галантамин + тестостерон.

¹ Отдел нейрофармакологии им. акад. С. В. Аничкова (руководитель — проф. П. Д. Шабанов) ФГБУ “НИИ экспериментальной медицины” СЗО РАМН, 197376, Санкт-Петербург, ул. акад. Павлова, 12.

Адьювантный артрит индуцировали на следующий день после введения препаратов путем инокуляции 200 мкл полного адьюванта Фрейнда (ПАФ; "Sigma"). ПАФ вводили под апоневроз правой задней лапы. На 7, 14 и 21-е сутки измеряли диаметр отека лап и голеностопных суставов с помощью микрометра (в мм) и оценивали наличие язв на пораженных участках [1].

Концентрацию дофамина (в нг/мг) и его метаболита дигидроксифенилуксусной кислоты (ДОФУК) в селезенке измеряли методом ВЭЖХ в системе Beckman System Gold с электрохимическим детектором LC-4C на 21-е сутки после индукции артрита. Для хроматографического анализа брали 100 мг ткани селезенки, которую гомогенизировали через микропористое сито в охлажденной 0,1n хлорной кислоте, центрифугировали при 1400 g в течение 7 мин при 4 °С. Полученный супернатант фильтровали и вводили в систему ВЭЖХ-ЭД. Разделение пиков проходило в хроматографической колонке SphreClone 5 μ ODS 2 (250 \times 4,6 мм) с предколонкой. Аналитическое время пробега пробы в колонке составляло 18 мин при изокритической скорости 1 мл/мин. Подвижная фаза — 0,1 М цитратно-фосфатный буфер, содержащий 0,3 мМ октилсульфата натрия, 0,1 мМ этилендиаминтетраацетата натрия, 8 % ацетонитрила (рН 3,2) ("Sigma", Германия). Идентификацию и количественную оценку дофамина и его метаболита ДОФУК осуществляли в сравнении с внешним стандартом.

Результаты представлены в виде средней арифметической \pm SEM. Статистическую обработку проводили с использованием t-критерия Стьюдента и дисперсионного анализа ANOVA. Различия считали достоверными при $p \leq 0,05$. Использовали компьютерную программу Origin® 7.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Иницируя адьювантный артрит после введения животным галантамина и/или тестостерона, мы исходили из известных данных о том, что фармакологические агенты с низкой молекулярной массой (например, дибазол) способны изменять иммунную реакцию, то есть функциональную активность В- и Т-лимфоцитов, в течение до 45 сут [2]. Полученные данные подтвердили, что введение галантамина и/или тестостерона перед индукцией адьювантного артрита изменяет развитие патологического состояния, в сравнении с артритной реакцией у контрольных животных (таблица).

Применение галантамина при нормальном уровне тестостерона мало влияет на артритную реакцию (группа 2), за исключением снижения отека лап при локальной фазе артрита (7-е сутки, $p < 0,05$). У гонадэктомированных крыс галантамин (группа 6) более существенно снижает отечность лап и голеностопных суставов, по сравнению с заместительной терапией тестостероном (группа 7). По-видимому, данный факт можно объяснить тем, что накопление ацетилхолина на фоне галантамина приводит к стимуляции м-холинорецепторов с последующим усилением синтеза простогландина E_2 и простаглицлина [8], обладающих выраженным противовоспалительным действием. Известно, что холинергическая система вовлекается в регуляцию цитокинов [12]. В этом случае механизм системного противовоспалительного действия галантамина может включать блокаду продукции провоспалительных цитокинов ИЛ-1 и ИЛ-6, а также снижение функциональной активности В-лимфоцитов, продуцирующих провоспалительный ИЛ-10. Однако полностью предупредить развитие артрита с помощью галантамина невозможно, поскольку антителогенез при формировании артрита активируется в отсроченные

Влияние галантамина и тестостерона на объем поврежденной лапы и голеностопного сустава (в мм), наличие язв на лапах и голеностопных суставах у крыс с адьювантным артритом ($M \pm m$)

Группа крыс ($n = 12$), препарат	7-е сутки		14-е сутки		21-е сутки	
	Лапа	Сустав	Лапа	Сустав	Лапа	Сустав
1-я, контроль	9,0 \pm 0,2 (я)	10,2 \pm 0,6	9,2 \pm 0,9 (я)	10,1 \pm 0,7 (я)	10,3 \pm 1,3 (я)	11,1 \pm 1,4 (я)
2-я, галантамин	7,6 \pm 0,5 [○]	10,0 \pm 0,5	8,7 \pm 0,7 (я)	10,0 \pm 0,7 (я)	8,5 \pm 0,7 (я)	9,6 \pm 1,1 (я)
3-я, тестостерон	7,1 \pm 0,6 [○]	8,2 \pm 0,5 [○]	7,0 \pm 0,4 [○]	8,3 \pm 0,7 [○] (я)	8,0 \pm 0,7 (я)	8,9 \pm 0,5 (я)
4-я, тестостерон + галантамин	7,0 \pm 0,5 [○]	8,1 \pm 0,6 [○]	7,0 \pm 0,7 [○] (я)	9,7 \pm 0,9 (я)	9,1 \pm 1,6 (я)	10,0 \pm 1,3 (я)
5-я, гонадэктомия	6,9 \pm 0,3*	8,6 \pm 0,4*	6,5 \pm 0,6*	8,2 \pm 0,2*	6,6 \pm 0,6 (я)	9,0 \pm 0,4 (я)
6-я, гонадэктомия + галантамин	8,0 \pm 0,2*, x	8,5 \pm 0,5	6,6 \pm 0,6*	8,5 \pm 0,7*	7,1 \pm 0,4*	8,6 \pm 0,2* (я)
7-я, гонадэктомия + тестостерон	9,3 \pm 0,6 ^x	8,3 \pm 0,3	9,1 \pm 0,5 ^{x, y}	9,6 \pm 0,3 ^x	9,1 \pm 0,4 ^{x, y}	10,5 \pm 0,2 ^y (я)
8-я, гонадэктомия + тестостерон + галантамин	7,3 \pm 1,1	8,3 \pm 0,3	8,3 \pm 1,7	8,7 \pm 1,1 (я)	9,2 \pm 1,7 (я)	10,3 \pm 1,4 (я)

Примечание. (я) — язвы на лапах или на голеностопных суставах.

Отличия достоверны, $p < 0,05$: * — между 1-й и 5–8-й группами; [○] — между 1-й и 2–4-й группами; x — между 5-й и 6–8-й группами; y — между 6-й и 7-й группами.

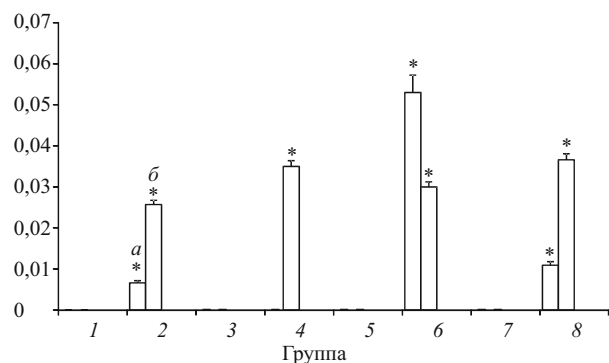
периоды (21 – 28-е сутки) [1]. По-видимому, галантамин через высвобождение ацетилхолина стимулирует м-холинорецепторы В-лимфоцитов, усиливая продукцию аутоантител в эти сроки. Кроме того, активированные м₃-холинорецепторы могут функционировать в качестве аутоантител [15] и быть антигенными [5] при аутоиммунных заболеваниях. Возможно, периферическое мускариноподобное действие галантамина можно снизить атропином или стимуляцией α7-подтипа н-холинорецепторов. Эти предположения требуют дальнейшего изучения.

У гонадэктомированных крыс введение тестостерона (группа 7) мало влияет на развитие отеков, но он или полностью блокирует (лапы), или замедляет (голеностопные суставы) появление язв на пораженных участках, где они образуются на локальной стадии развития (7-е сут). Введение тестостерона крысам без гонадэктомии (группа 3) снижает отек лап и голеностопных суставов.

Тестостерон может действовать на иммунную систему двумя путями: стимулируя рецепторы андрогена на CD4+ Т-лимфоцитах селезенки и сдвигая иммунную реакцию к Th2-ответу [9], а так же блокируя Toll-подобные рецепторы на поверхности макрофагов (негенотипный ответ тестостерона), уменьшая их экспрессию, и предупреждая продукцию провоспалительных цитокинов фактора некроза опухоли, ИЛ-1 и ИЛ-6 [13]. Вместе с тем, дефицит тестостерона (группа 5) также существенно снижает артритную реакцию: отеки лап и голеностопных суставов существенно ниже, чем в контроле.

Одновременное применение галантамина с тестостероном после гонадэктомии (группа 8) оказывает слабое противовоспалительное действие в сравнении с эффектами самого галантамина (группа 6), что может свидетельствовать о дисбалансе между андрогенной и холинергической системами, который приводит к утяжелению артритной реакции. Введение галантамина на фоне высокой концентрации тестостерона (группа 4) перед индукцией адьювантного артрита влияет в основном на его локальную фазу (уменьшение отека лап и голеностопных суставов на 7-е сутки).

Известно, что селезенка не иннервируется дофаминергической системой [4] и что действие дофамина на лимфоциты в патологических условиях слабо выражены [10]. Повышение уровня дофамина и его метаболита ДОФУК в ткани селезенки у животных в артритной фазе (21-е сутки после индукции артрита) показано в группах крыс с адьювантным артритом, предварительно получившим галантамин (группа 2) или его комбинацию с тестостероном (группа 4), но не сам тестостерон (группа 3, см. рисунок). Точный механизм действия дофамина в селезенке неизвестен. Однако существенное увеличение уровня дофамина при наиболее сниженной артритной реакции (гонадэктомированные крысы с адьювантным артритом, получившие галантамин, группа 6) позволило предположить, что галанта-



Содержание дофамина (а) и ДОФУК (б) в селезенке крыс с адьювантным артритом на 21-е сутки после приема препаратов (нг/мг).

1 — ПАФ (контроль), 2 — галантамин, 3 — тестостерон, 4 — галантамин + тестостерон, 5 — гонадэктомия, 6 — гонадэктомия + галантамин, 7 — гонадэктомия + тестостерон, 8 — гонадэктомия + галантамин + тестостерон.

* — $p < 0,001$.

мин инициируя синтез дофамина в лимфоцитах, может служить эффективным маркером снижения тяжести артрита при гипоандрогенном состоянии. Это подтверждают полученные нами данные о снижении дофамина и увеличении продукта его деградации ДОФУК в группе гонадэктомированных животных с адьювантным артритом, получивших одновременно галантамин и тестостерон (группа 8), а также в группах неоперированных крыс с адьювантным артритом, которым вводили галантамин или его комбинацию с тестостероном (группы 2 и 4 соответственно). Однако любая связь между введением галантамина, индуцирующим увеличение эндогенного ацетилхолина, тестостерона и появлением дофамина в селезенке не объясняет противовоспалительного эффекта препаратов. Механизмы развития этих эффектов требуют дальнейшего изучения.

ВЫВОД

Галантамин (1 мг/кг, внутривенно, 10 сут) гонадэктомированными самцами крыс перед индукцией артрита снижает экссудативную (отек лап в 1,5 раза) и воспалительную (отек голеностопных суставов в 1,3 раза) стадии артрита и вызывает увеличение концентрации дофамина в спленоцитах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Г. И. Нежинская, Н. С. Сапронов, *Пат. физиол. и эксперим. терапия*, № 3, 11 – 13 (2001).
2. Г. И. Нежинская, Н. С. Сапронов, *Пат. физиол. и эксперим. терапия*, № 3, 22 – 25 (2002).
3. Г. И. Нежинская, А. Л. Владыкин, Н. С. Сапронов, *Усп. соврем. биол.*, **130**(2), 154 – 164 (2010).
4. A. Bencsics, H. Serhsen, M. Baranyi, et al., *Brain Res.*, **761**(2), 236 – 243 (1997).
5. M. De'ak, A. Szvetnik, A. Balog, et al., *Neuroimmunomodulation*, **20**(2), 79 – 86 (2012).
6. K. Ganesan, R. Selvan, N. V. Rain, et al., *Reumatol. Int.*, **28**(4), 345 – 353 (2008).

7. K. Kawashima, T. Fujii, H. Visawa, et al., *Ann. NY Acad. Sci.*, № 1261, 7 – 17 (2012).
8. D. Lamontagne, A. Koning, E. Bassenge, R. Busse, *J. Cardiovasc Pharmacol.*, **20**(4), 652 – 657 (1992).
9. S. M. Liva, R. R. Voskuhi, *J. Immunology*, **167**(4), 2060 – 2067 (2001).
10. F. McKenna, P. J. McLaughlin, B. J. Lewis, et al., *J. Neuroimmunol.*, **132**(1 – 2), 34 – 40 (2002).
11. K. Nakano, S. Matsushita, K. Saito, et al., *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi.*, **32**(1), 1 – 6 (2009).
12. V. A. Pavlov, W. R. Parrish, M. Rosas-Balina, et al., *Brain Behav. Immun.*, **23**(1), 41 – 45 (2009).
13. J. A. Rettew, V. M. Huet-Hudson, I. Marriott, *Biol. Reprod.*, **78**(3), 432 – 437 (2008).
14. J. Schubert, J. Beckman, S. Yartmann, et al., *Life Ski.*, **91**(21 – 22), 1048 – 1052 (2012).
15. I. T. Sumida, M. Iizuka, H. Asashima, et al., *Presse Med.*, **41**(9 Pt 2), 461 – 466 (2012).
16. F. Vandenabeele, I. Lambrichts, P. Lippens, J. Creemers, *Arch. Histol. Cytol.*, **64**(1), 1 – 16 (2001).
17. M. C. Willett, D. E. Dluzen, *Brain Res.*, **1029**(2), 186 – 194 (2004).

Поступила 19.11.13

EFFECT OF GALANTAMINE AND TESTOSTERONE ON THE ARTHRITIC RESPONSE AND DOPAMINE CONTENT IN RAT SPLEEN

G. I. Nezhinskaya, N. S. Sapronov, N. R. Evdokimova, and P. D. Shabanov

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

The study was carried out on male Wistar rats with surgically ablated gonads. The rats with gonadectomy and intact rats received galantamine and/or testosterone over 10 days, after which the model arthritis was induced by injection of 200 µl of complete Freund's adjuvant. It was established that gonadectomy reduced arthritic reactions producing ulcer formation at a later time (21 days) as compared to control (rats with arthritis), where they are formed on the local stage of development (day 7). Testosterone replacement therapy completely blocks the development of ulcers on the paws. Galantamine suppresses the arthritic reaction more significantly, reducing paws and ankle-joint edema 1.5 and 1.3 times respectively ($n = 12, p < 0.05$). The appearance of dopamine in the spleen during galantamine treatment may serve as a marker of protective action of the drug under hypoandrogenic conditions. Introduction of galantamine at high level of testosterone does not significantly influence on development of arthritic reaction, which is indicative of a marked imbalance between the hormonal and cholinergic systems and a possibility to modulate arthritic reaction with cholinergic drugs.

Keywords: spleen, adjuvant arthritis, galantamine, testosterone, dopamine, rats