

# ИММУНОФАРМАКОЛОГИЯ

## ВЛИЯНИЕ ХОЛИНЕРГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ И БЕЛКОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ НА РАЗВИТИЕ РЕАКЦИИ АРТЮСА

Г. И. Нежинская, А. Л. Владыкин, Н. С. Сапронов<sup>1</sup>

Оценка влияния холинергических препаратов и белков плазмы крови на развитие реакции Артюса показала, что среди них антагонист m-AchR ипратропия бромид и CRP, ограничивая уровень системного иммунного ответа при развитии гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ), могут полностью блокировать развитие реакции Артюса. Агонисты m- и/или n-AchR ацетилхолин, никотин, а также  $\gamma$ -глобулин и альбумин отодвигают ее развитие на более поздние сроки, в отличие от гексаметония, который усиливает развитие ГЗТ, функции В-лимфоцитов, приводя к усилению реакции Артюса.

**Ключевые слова:** реакция Артюса, агонисты и антагонисты m-, n-холинорецепторов, гиперчувствительность, В-лимфоциты, белки плазмы крови

### ВВЕДЕНИЕ

Ранее на модели анафилактического шока у морских свинок была показана возможность предупреждения антагонистами m-холинорецепторов (m-AchR) патохимической стадии шока [3], но не его стадии сенсibilизации [13]. Реакция гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) служит адекватной моделью стадии сенсibilизации [7], на которой можно исследовать эффекты препаратов. Известно, что фаза инициации ГЗТ определяется выбросом вазоактивных веществ, проникновением Т-эффекторов ГЗТ в очаг воспаления [5]. Однако также известно, что активность Fc-рецепторов В-лимфоцитов играет важную роль в развитии сенсibilизации [15], что позволяет использовать эти рецепторы в качестве потенциальной “мишени” иммунотерапии [14]. Показано, что факторами, предупреждающими появление ГЗТ, являются активация холинергической системы и супрессия антителогенеза спленоцитов [12]. Ими могут быть также ингибирующие эффекты кортикостерона, уровень которого повышается при активации паравентрикулярного ядра, вызванного возбуждением n-AchR гипоталамуса [11]. Роль белков плазмы крови в развитии реакции ГЗТ и реакции Артюса практически не известна. Целью работы являлось изучение влияния агонистов и антагонистов m- и n-AchR, а также белков плазмы крови на развитие ГЗТ, функции В-лимфоцитов и развитие реакции Артюса.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты выполнены на самцах мышей-гибридов линий (СВА · С57BL/6)F<sub>1</sub>, массой 18 – 20 г (*n* = 140), по-

лученных из питомника Рапполово РАМН, которых содержали в виварии в режиме 12-часового светового дня при температуре 22 °С на обычном рационе. Мышей сенсibilизировали подкожной инъекцией в основание хвоста 0,02 мл полного адьюванта Фрейнда (ПАФ, “Sigma”) [2]. Развитие ГЗТ оценивали по отеку хвоста через 30 мин, 3, 6 и 24 ч после введения ПАФ [9]. Реакцию Артюса инициировали введением разрешающей дозы ПАФ (0,02 мл через 2 нед после сенсibilизации). Степень повреждения кожных покровов оценивали ежедневно в течение 28 сут.

Агонист m- и n-AchR ацетилхолин (2,5 мг/кг), агонист n-AchR никотин (0,5 мг/кг), антагонисты m-AchR метацин (2 мг/кг) и ипратропия бромид (атровент) (0,01 мг/кг), антагонист n-AchR гексаметоний (бензогексоний) (10 мг/кг), антихолинэстеразный препарат неостигмин (прозерин) (0,02 мг/кг) [1], альбумин (500 мг/кг),  $\gamma$ -глобулин (98 % очищенного IgG) или CRP (по 1 мг/кг) вводили одновременно с сенсibilизирующей дозой ПАФ. Комбинацию ипратропия бромида с неостигмином вводили за 30 мин до инициации ГЗТ, а метацина с неостигмином — за 25 и 15 мин соответственно. Контролем являлись мыши, получившие сенсibilизирующую и разрешающую дозы ПАФ (по 0,02 мл).

Количество антителообразующих клеток (АОК/10<sup>6</sup> спленоцитов) определяли на 14-е сутки после сенсibilизации и введения препаратов [10]. Контролем служили мыши, иммунизированные эритроцитами барана и получавшие физиологический раствор.

Результаты представлены в виде значения величины  $\pm$  SEM. Статистическую обработку материалов проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента при помощи пакета программ Statistica 6.0.

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

Таблица 1. Влияние холинергических препаратов и белков плазмы крови на развитие реакции ГЗТ

Препарат	Диаметр основания хвоста (мм) в разные сроки после введения препаратов			
	30 мин	1 ч	6 ч	24 ч
Физиологический раствор (интактные мыши)	3,0 ± 0,01	3,0 ± 0,02	2,9 ± 0,03	2,9 ± 0,01
Контроль, ПАФ	4,5 ± 0,2*	3,8 ± 0,2*	4,3 ± 0,4*	3,0 ± 0,1
Метацин, 2 мг/кг	3,1 ± 0,1	3,4 ± 0,2	3,4 ± 0,1*	3,0 ± 0,1
Ипратропия бромид, 0,01 мг/кг	3,4 ± 0,1*	3,4 ± 0,2	3,9 ± 0,2*	3,5 ± 0,1*
Метацин, 2 мг/кг + неостигмин, 0,02 мг/кг <sup>1</sup>	4,0 ± 0,1*	4,0 ± 0,2*	4,6 ± 0,1*	3,5 ± 0,1*
Ипратропия бромид, 0,01 мг/кг + неостигмин, 0,02 мг/кг <sup>2</sup>	3,3 ± 0,1	4,0 ± 0,2*	3,8 ± 0,2*	4,1 ± 0,3*
Гексаметоний, 10 мг/кг	3,5 ± 0,03*	3,5 ± 0,1*	4,2 ± 0,3*	3,7 ± 0,2*
Ацетилхолин, 2,5 мкг/кг	3,7 ± 0,1*	4,0 ± 0,1*	3,7 ± 0,1*	3,8 ± 0,1*
Никотин, 0,5 мг/кг	4,5 ± 0,2*	3,8 ± 0,2*	4,3 ± 0,4*	3,0 ± 0,1
γ-Глобулин, 1 мг/кг	3,6 ± 0,5	3,8 ± 0,2*	4,0 ± 0,1*	3,5 ± 0,2*
С-реактивный белок, 1 мг/кг	2,9 ± 0,1	3,3 ± 0,2	3,1 ± 0,2	3,1 ± 0,1
Альбумин, 500 мг/кг	3,8 ± 0,3*	3,6 ± 0,2*	3,6 ± 0,2*	3,7 ± 0,2*

**Примечание.** Препараты вводили одновременно с сенсибилизирующей дозой ПАФ (0,02 мл подкожно); <sup>1</sup> — метацин вводили за 25 мин, а неостигмин — за 15 мин до введения ПАФ; <sup>2</sup> — ипратропия бромид + неостигмин — за 30 мин до введения ПАФ; \* —  $p < 0,05$  по сравнению с интактными животными.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Введение сенсибилизирующей дозы ПАФ в основание хвоста мышам (контроль) обеспечивало развитие классической реакции ГЗТ (через 24 ч), регистрируемое по размерам его отека. Введение холинергических препаратов мало влияло на фазу инициации ГЗТ (30 мин, 1, 6 ч) по сравнению с контролем (табл. 1). Однако через 24 ч отеки отсутствовали в контроле и у

мышей, получивших метацин или никотин, по сравнению с пролонгирующими эффектами других холинергических препаратов. Из белков CRP предупреждал, а альбумин и γ-глобулин усиливали выраженность ГЗТ (табл. 1). Ранее мы показали, что CRP, введенный при сенсибилизации, снижает развитие анафилаксии [13]. Эффекты влияния препаратов и белков на стадию экссудации при воспалении не вполне понятны и требуют детального исследования.

Таблица 2. Влияние холинергических препаратов и белков плазмы крови на содержание АОК (на 10<sup>6</sup> спленоцитов) при системном иммунном ответе<sup>X</sup>, вызванном введением сенсибилизирующей дозы ПАФ

Препарат	АОК/10 <sup>6</sup> спленоцитов
Контроль	418 ± 10
ПАФ (сенсибилизирующая доза — 0,02 мл подкожно)	728 ± 61*
Метацин, 2 мг/кг	692 ± 26*
Ипратропия бромид, 0,01 мг/кг	480 ± 52
Метацин, 2 мг/кг + неостигмин, 0,02 мг/кг	630 ± 54*
Ипратропия бромид, 0,01 мг/кг + неостигмин, 0,02 мг/кг	460 ± 61
Ацетилхолин, 2,5 мкг/кг	400 ± 34
Никотин, 0,5 мг/кг	450 ± 27
Гексаметоний, 10 мг/кг	890 ± 36*
γ-Глобулин, 1 мг/кг	289 ± 62
С-реактивный белок, 1 мг/кг	300 ± 43*
Альбумин, 500 мг/кг	290 ± 47*

**Примечание.** <sup>X</sup> — системный иммунный ответ (14-е сутки), вызванный введением сенсибилизирующей дозы ПАФ. Контролем служили интактные мыши, иммунизированные эритроцитами барана (2 · 10<sup>6</sup> клеток/мышь в 0,3 мл физиологического раствора) и получившие внутривенную инъекцию физиологического раствора. \* —  $p < 0,01$  — отличия достоверны по сравнению контролем.

Оценка уровня АОК спленоцитов при системном иммунном ответе (14-е сутки после сенсибилизации) показала, что гексаметоний, как и ПАФ, значительно повышает их число, в отличие от других препаратов и белков (табл. 2). Показано, что оценка уровня сенсибилизации, возникшей в ответ на введение ПАФ, позволяет прогнозировать степень развития реакции Артюса. Так, введение разрешающей дозы ПАФ мышам, получившим гексаметоний, привело к раннему развитию реакции Артюса, которая, как и в контроле, сохранялась в течение 21 сут. Другие холинергические препараты, так же как γ-глобулин или альбумин, отодвигали ее развитие на более поздние сроки, в отличие от CRP, который полностью предупреждал повреждение кожных покровов (табл. 3). Известно, что противовоспалительная активность CRP обусловлена его способностью связывать иммунные комплексы [8], блокировать FcγR на лейкоцитах, предупреждая таким образом возможность “окислительного взрыва” [6] и продукцию медиаторов воспаления [4].

## ВЫВОД

На модели гиперчувствительности замедленного типа изменение активности холинергической и иммунной систем, инициированное препаратами, существенно отражается на развитии реакции Артюса: ип-

Таблица 3. Влияние холинергических препаратов на развитие реакции Артюса<sup>x</sup> у мышей-гибридов (СВА · С57BL/6) F<sub>1</sub>

Препарат	Площадь (мм <sup>2</sup> ) и число (%) язв после введения разрешающей дозы ПАФ			
	3-и сутки	7-е сутки	14-е сутки	21-е сутки
Контроль (ПАФ)	2,0 ± 0,5 (29 %)	30,0 ± 9 (28 %)	19,8 ± 5 (57 %)	31,0 ± 5 (43 %)
Метацин, 2 мг/кг	23 ± 7* (38 %)	34 ± 2 (25 %)	26,6 ± 11 (75 %)	46,0 ± 21 (25 %)
Ипратропия бромид, 0,01 мг/кг	нет язв	нет язв	нет язв	нет язв
Метацин, 2 мг/кг + неостигмин, 0,02 мг/кг	48 ± 5* (11 %)	63,5 ± 4* (50 %)	21,6 ± 7 (62,5 %)	15 ± 7 (30 %)
Ипратропия бромид, 0,01 мг/кг + неостигмин, 0,02 мг/кг	нет язв	нет язв	4 ± 0,5* (33 %)	нет язв
Гексаметоний, 10 мг/кг	12,0 ± 1* (17 %)	18 ± 8 (50 %)	7,0 ± 1,6* (60 %)	6,7 ± 2,6* (40 %)
Ацетилхолин, 2,5 мкг/кг	нет язв	20 ± 3 (14 %)	24 ± 3 (14 %)	засохшие язвы
Никотин, 0,5 мг/кг	нет язв	30 ± 4 (14 %)	15,5 ± 7 (14 %)	заживающие язвы
γ-Глобулин, 1 мг/кг	нет язв	22,0 ± 6 (40 %)	8,5 ± 2 (20 %)	заживающие язвы
С-реактивный белок, 1 мг/кг	нет язв	нет язв	нет язв	нет язв
Альбумин, 500 мг/кг	нет язв	нет язв	15 ± 3 (33 %)	12 ± 1* (33 %)

**Примечание.** <sup>x</sup> — образование язв в основании хвоста после введения разрешающей дозы ПАФ; \* —  $p < 0,05$  по сравнению с контрольными мышами, сенсibilizированными ПАФ.

ратропия бромид предупреждает, а ацетилхолин и никотин, комбинация ипратропия бромида с неостигмином отодвигают ее появление на более поздние сроки.

## ЛИТЕРАТУРА

1. М. Д. Машковский, *Лекарственные средства*, 15-е изд., ООО "Новая Волна", Москва (2007).
2. Н. В. Медуницин, *Повышенная чувствительность замедленного типа*, Медицина, Москва (1983).
3. Г. И. Нежинская, Н. А. Лосев, П. Г. Назаров и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **68**(4), 49 – 52 (2005).
4. I. Anegon, M. Cuturi, G. Trinchieri, et al., *J. Exp. Med.*, **167**, 452 (1988).
5. P. W. Askenase, *Middleton's Allergy Principles and Practice*, Philadelphia St. Louis (2003), pp. 425 – 451.
6. E. Crockett-Torabi and J. C. Fantone, *J. Immunol.*, **145**, 3026 (1990).
7. S. Grabbe and T. Schwarz, *Immunol. Today*, **19**, 37 – 44 (1998).
8. M. D. Hulett and P. M. Hogarth, *Adv. Immunol.*, **57**, 11 – 27 (1994).
9. J. F. Jacysyn, I. A. Abrahamsohn, and M. S. Macedo, *Immunology*, **102**, 373 – 379 (2001).
10. N. Jerne, C. Henry, A. Nordin, et al., *Transplant. Rev.*, **18**, 130 – 191 (1974).
11. K. Kubo, T. Kita, T. Tsujimura, et al., *J. Pharmacol. Sci.*, **94**, 31 – 38 (2004).
12. T. Kunimatsu, Y. Kamita, N. Isobe, et al. *Fundamental and Applied Toxicology*, **33**(2), 246 – 253 (1996).
13. G. I. Nezhinskaya, A. L. Vladyskin, and N. S. Saponov, *Life Sci.*, **80**, 2342 – 2346 (2007).
14. J. V. Ravetch, *J. Clin. Invest.*, **110**, 1759 – 1761 (2002).
15. R. F. Tsuji, M. Szczepanik, I. Kawikova, et al., *J. Exp. Med.*, **196**, 1277 – 1290 (2002).

Поступила 21.12.07

## EFFECTS OF CHOLINERGIC DRUGS AND BLOOD PLASMA PROTEINS ON THE DEVELOPMENT OF ARTHUS REACTION IN MICE

G. I. Nezhinskaya, A. L. Vladyskin, and N. S. Saponov

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

Delayed-type hypersensitivity (DTH) reaction was induced in (CBA × C57BL/6)F<sub>1</sub> mice by subcutaneous injection of complete Freund adjuvant (0.02 ml) at the base of the tail. The effects of methacine (2 mg/kg), ipratropium bromide (0.01 mg/kg), their combinations with neostigmine (0.02 mg/kg), hexamethonium (10 mg/kg), acetylcholine (2 μg/kg), nicotine (0.5 mg/kg), gamma globulin and CRP (both 1 mg/kg), and albumin (500 mg/kg) on DTH reaction development, B cell functions and Arthus reaction were investigated. It was established that ipratropium bromide and CRP prevented Arthus reaction development. The administration of acetylcholine, nicotine, and combinations of muscarinic antagonists with neostigmine, as well as gamma globulin and albumin resulted in the later onset of Arthus reaction. The administration of hexamethonium increased DTH reaction and led to early appearance of the Arthus reaction and its maintenance during 21 days. These results demonstrate the role of cholinergic system and plasma proteins in the organism sensitization development.