

**ВЛИЯНИЕ ОБРАТИМОГО ИНГИБИРОВАНИЯ ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ И НИКОТИНА  
НА ЛЕТАЛЬНОСТЬ МЫШЕЙ И СОДЕРЖАНИЕ В КРОВИ  
ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ В РАННЕЙ ФАЗЕ СЕПСИСА**

**П.Ф. Забродский, В.Г. Лим, А.В. Кузьмин**

*Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского*

В экспериментах на неинбредных белых мышах установлено, что обратимый ингибитор холинэстеразы прозерин и н-холиномиметик никотин (эквилетальная доза 0,2 DL<sub>50</sub>, однократно) при их введении за 2 ч до моделирования сепсиса вызывают существенное снижение летальности мышей от экспериментального инфекционного процесса вследствие уменьшения в крови концентрации провоспалительных цитокинов ФНО $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-6 .

---

**Ключевые слова:** *сепсис, холинергический противовоспалительный механизм, ингибирование холинэстеразы, никотин, цитокины*

Saratov State Medical University named after V.I. Razumovsky, Russia

**INFLUENCE OF REVERSIBLE INHIBITION OF A CHOLINESTERASE AND  
NICOTINE ON A LETHALITY OF MICE AND CONCENTRATION IN BLOOD OF  
PROINFLAMMATORY CYTOKINES IN EARLY PHASE OF SEPSIS**

**P.F.Zabrodskii, V.G.Lim, A.V.Kuzmin**

It was established in experiments on noninbred mice that reversible inhibitor of cholinesterase neostigmine methylsulfate (proserine) and n-cholinomimetic nicotine (equilethal dose 0,2 DL<sub>50</sub>, it is single-pass) at their injection 2 h prior to sepsis modelling invoke essential depression of a lethality of mice from experimental infectious process owing to reduction in a blood of concentration of proinflammatory cytokines TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6.

---

**Keywords:** *sepsis, cholinergic anti-inflammatory pathway, inhibition of cholinesterase, nicotine, cytokines*

**Адрес для корреспонденции:** [pfzabrodsky@gmail.com](mailto:pfzabrodsky@gmail.com) Забродский П.Ф.

Холинергическая стимуляция существенно снижает летальность белых мышей от сепсиса, вызванного внутрибрюшинным или внутрилегочным введением соответственно *E. coli* [1,2,3,4] и *Proteus vulgaris* [5]. В 1995 году была доказана целесообразность использования холиномиметиков для экстренной активации неспецифической антимикробной резистентности организма при различных инфекционных процессах [2]. В последующем в многочисленных исследованиях [7,10,11,12] была подтверждена роль активации холинергической системы в снижении летальности животных при сепсисе, вызванном различными инфекционными процессами.

Увеличение выживаемости животных после холинергической стимуляции (действие холиномиметиков [1,2,3]), в настоящее время объясняют реализацией «холинергического противовоспалительного механизма» («cholinergic anti-inflammatory pathway») [9,11,13].

Холинергическая стимуляция приводит к активации ацетилхолином (АХ)  $\alpha 7$ -никотиновых холинорецепторов ( $\alpha 7nAChR$ ) клеток моноцитарно-макрофагальной системы - ММС (моноцитов, макрофагов и нейтрофилов), что приводит к уменьшению летальности от экспериментальной инфекции [7,8,11,12] вследствие снижения продукции клетками ММС [10,11] и лимфоидными дендритными клетками [6] провоспалительных цитокинов - фактора некроза опухоли- $\alpha$  (ФНО $\alpha$ ), ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-6 [9,10,11,14,15]. Такой же эффект, вероятно, способно вызвать воздействие на  $\alpha 7nAChR$  никотина.

Целью исследования являлась оценка влияния обратимого ингибирования ацетилхолинэстеразы, а также никотина на летальность мышей в ранней фазе сепсиса и содержание в плазме крови провоспалительных цитокинов ФНО $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-6.

## **МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ**

Опыты проводили на беспородных белых мышах обоего пола массой 18-22 г. Обратимый ингибитор холинэстеразы прозерин и н-холиномиметик никотин вводили подкожно однократно в дозе 0,2 DL<sub>50</sub> (DL<sub>50</sub> данных препаратов составляли для мышей соответственно 0,55±0,10 и 0,35±0,07 мг/кг). Через 2 ч после введения холинергических препаратов у мышей вызывали сепсис внутриперитонеальным введением 2,5·10<sup>9</sup> суточной культуры микробных тел *E. coli* [1,14]. Регистрацию летальности мышей проводили без применения холинергических средств (контрольная группа 1) и с применением прозерина (группа 2) и никотина (группа 3) через 10 и 25 ч после моделирования септического процесса. Сроки оценки летальности обусловлены тем, что через 10 ч погибала значительная часть животных, а через 25 ч гибель животных от сепсиса достигала максимума и практически заканчивалась [1,5]. Концентрацию цитокинов ФНО $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-6 исследовали в плазме крови контрольной группы мышей (контрольная группа 2, интактные животные) и мышей, выживших через 10 и 25 ч в и после внутриперитонеального введения

*E. coli* без применения холинергических препаратов (контрольная группа 1), с применением прозерина (группа 2) и никотина (группа 3) методом ферментного иммуносорбентного анализа (ELISA), используя наборы (ELISA Kits) фирмы BioSource Int. Кровь для исследований забирали из ретроорбитального венозного синуса. Полученные данные обрабатывали статистически с использованием t-критерия достоверности Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При исследовании летальности белых мышей после моделирования сепсиса с применением и без применения холинергических препаратов установлено (табл. 1), что

**Таблица 1.** Влияние прозерина и никотина на летальность мышей после моделирования сепсиса ( $M \pm m$ ,  $n = 30$ )

Серии опытов	Срок исследования летальности после введения <i>E. coli</i> , ч	
	10	25
Сепсис (контрольная группа 1)	66,7±8,6	83,3±6,9
Прозерин + сепсис (группа 2)	36,7±8,8*	60,0±8,9*
Никотин + сепсис (группа 3)	30,0±8,4*	53,3±9,1*

**Примечание.** \* - $p < 0,05$  по сравнению с контролем.

прозерин и никотин через 10 ч после внутриперитонеального введения *E. coli* приводили к снижению ( $p < 0,05$ ) исследованного показателя по сравнению с контрольной группой 1 (сепсис) соответственно на 30,0 и 36,7%, а через 25 ч – на 23,3 и 30,0% ( $p < 0,05$  соответственно). Полученные результаты позволяют полагать, что уменьшение летальности мышей при моделировании сепсиса после применения обратимого ингибитора холинэстеразы прозерина и н-холиномиметика никотина обусловлено активацией АХ и никотином рецептора  $\alpha 7nAChR$  клеток ММС [7].

Концентрация провоспалительных цитокинов ФНО $\alpha$ , ИЛ1 $\beta$  и ИЛ-6 в плазме крови мышей при сепсисе (контрольная группа 1) значительно увеличивается ( $p < 0,05$ ) по сравнению со 2-й контрольной группой мышей (интактные животные) через 10 ч при сепсисе соответственно в 4,9; 14,0 и 21,7 раза (табл. 2)

Концентрация в крови мышей ФНО $\alpha$ , ИЛ1 $\beta$  и ИЛ-6 после применения прозерина (группа 2) с последующим моделированием сепсиса через 10 ч уменьшалось по сравнению с показателями при сепсисе без использования данного холиномиметика (контрольная группа 1) соответственно в 1,6; 2,1 и 2,4 раза ( $p < 0,05$ ). При этом содержание провоспалительных цитокинов достоверно ( $p < 0,05$ ) превышало показатели контрольной группы 2 (интактные животные).

Введение никотина до моделирования сепсиса (группа 3) приводило через 10 ч после внутрибрюшинного введения *E. coli* мышам к снижению концентрации в плазме крови

ФНО $\alpha$ , ИЛ1 $\beta$  и ИЛ-6 по сравнению показателями при сепсисе без применения холинергических препаратов (контрольная группа 1) соответственно в 1,8; 2,4 и 2,7 раза ( $p<0,05$ ). В целом никотин вызывал более выраженную редукцию исследованных показателей, хотя параметры при сепсисе с использованием прозерина (группа 2) и никотина (группа 3) практически не отличались. При этом содержание цитокинов достоверно ( $p<0,05$ ) превышало контрольные уровни.

**Таблица 2.** Влияние прозерина и никотина на концентрацию провоспалительных цитокинов в крови мышей при сепсисе через 10 и 25 ч, пг/мл (M $\pm$ m)

Серии опытов	ФНО $\alpha$		ИЛ1 $\beta$		ИЛ-6	
	10	25	10	25	10	25
Контрольная группа 2 (интактные животные)	39 $\pm$ 6 (7)	42 $\pm$ 4 (7)	29 $\pm$ 3 (7)	24 $\pm$ 3 (7)	35 $\pm$ 4 (7)	30 $\pm$ 4 (7)
Сепсис (контрольная группа 1)	190 $\pm$ 20 <sup>a</sup> (10)	63 $\pm$ 16 <sup>ac</sup> (5)	405 $\pm$ 42 <sup>a</sup> (10)	117 $\pm$ 27 <sup>ac</sup> (5)	760 $\pm$ 80 <sup>a</sup> (10)	332 $\pm$ 83 <sup>ac</sup> (5)
Прозерин + сепсис (группа 2)	119 $\pm$ 12 <sup>ab</sup> (9)	49 $\pm$ 5 <sup>c</sup> (9)	191 $\pm$ 20 <sup>ab</sup> (9)	56 $\pm$ 6 <sup>abc</sup> (9)	313 $\pm$ 34 <sup>ab</sup> (9)	150 $\pm$ 17 <sup>abc</sup> (9)
Никотин + сепсис (группа 3)	105 $\pm$ 11 <sup>ab</sup> (10)	45 $\pm$ 5 <sup>c</sup> (9)	167 $\pm$ 17 <sup>ab</sup> (10)	51 $\pm$ 6 <sup>abc</sup> (9)	282 $\pm$ 30 <sup>ab</sup> (10)	167 $\pm$ 18 <sup>abc</sup> (9)

**Примечание.** 10 и 25 – срок после моделирования сепсиса, ч; в скобках – число животных в опыте; <sup>a</sup> - $p<0,05$  по сравнению с контрольной группой 2; <sup>b</sup> - $p<0,05$  по сравнению с соответствующим параметром при сепсисе (контрольной группы 1); <sup>c</sup> - $p<0,05$  по сравнению с показателем через 10 ч.

Менее выраженное по сравнению с показателями контрольной группы 2 (интактные животные), уменьшение концентрации цитокинов зарегистрировано при сепсисе без применения холиномиметиков (контрольная группа 1) через 25 ч после внутрибрюшинного введения мышам *E. coli*.

Содержание в крови ФНО $\alpha$ , ИЛ1 $\beta$  и ИЛ-6 через 25 ч после моделирования сепсиса во всех сериях опытов (контрольная группа 1, группы 2 и 3) существенно снижалось ( $p<0,05$ ) по сравнению с концентрациями цитокинов через 10 ч после введения *E. coli*. Содержание провоспалительных цитокинов в крови через 25 ч оставалось выше значений контрольной группы 2 ( $p<0,05$ ), за исключением уровня ФНО $\alpha$ , который практически не отличался от контрольного показателя (контрольной группы 2). При воздействии прозерина (группа 2) и никотина (группа 3) с последующим моделированием сепсиса концентрация ФНО $\alpha$  была ниже по сравнению с показателями при сепсисе (контрольная группа 1) соответственно в 1,3

и 1,4 раза ( $p > 0,05$ ). Концентрации в крови цитокинов при сепсисе с применением прозерина и никотина практически не отличались.

Установленные изменения содержания провоспалительных цитокинов в плазме крови мышей свидетельствуют о том, что при использовании прозерина АХ, воздействуя на  $\alpha 7nAChR$  моноцитов, макрофагов и нейтрофилов [8,9] (возможно, и естественных клеток-киллеров [2]), приводит к реализации «холинергического противовоспалительного механизма» [1,2,3,4,5,15], снижая в крови и органах, имеющих ММС (печень, желудочно-кишечный тракт, селезенка), содержание провоспалительных цитокинов ФНО $\alpha$ , ИЛ1 $\beta$  и ИЛ-6. Эти цитокины вызывают различные патологические реакции, приводящие к летальному исходу при сепсисе (и других инфекционных патологических состояниях) [11,12]. При введении никотина данный холиномиметик активирует  $\alpha 7nAChR$  клеток ММС и вызывает (несущественно) более выраженный эффект, чем прозерин, в эквивалентной дозе.

Снижение летальности животных через 1-2 сут после воздействия обратимых и необратимых ингибиторов холинэстеразы (в том числе, фосфорорганических соединений), АХ и м-холиномиметика ацеклидина [1,2,3,4], обусловлено не только взаимодействием АХ с  $\alpha 7nAChR$  макрофагов, моноцитов и нейтрофилов [11], но и с активацией гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы с последующим увеличением в крови кортикостероидов [5]. Кроме того, увеличение антимикробной неспецифической резистентности организма может быть связано с активацией АХ и м-холиномиметиками м-холинорецепторов клеток ММС, приводящей к увеличению фагоцитарно-метаболической активности нейтрофилов, а также к повышению бактерицидной активности сыворотки крови, продукции клетками крови лизоцима и тромбоцитарного катионного белка [2,5].

Следует отметить, что проведенные исследования в ранней фазе сепсиса характеризуют влияние холинергических препаратов при моделировании сепсиса не на реакции гуморального и клеточного иммунитета, а на антиинфекционную неспецифическую резистентность организма [1,2,3,4]. Синтез ИЛ-6 Th2-лимфоцитами (и клетками Th0-типа) в ответ на введение *E. coli* начинается в период формирования иммунного ответа только через 5-7 сут после попадания в организм данного антигена [6].

Таким образом, обратимый ингибитор холинэстеразы прозерин и н-холиномиметик никотин (эквивалентная доза 0,2 DL<sub>50</sub>, однократно) при их введении за 2 ч до моделирования сепсиса вызывают существенное снижение летальности мышей от экспериментального инфекционного процесса вследствие уменьшения в крови концентрации провоспалительных цитокинов ФНО $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-6.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Забродский П.Ф. //Фармакол. и токсикол. 1987. Т 49, №2. С. 57-60.
2. Забродский П.Ф. // Бюл. эксперим. биол. и мед. 1995. Т. 119, № 8. С. 164 - 167.
3. Забродский П.Ф. // Иммунология. - 1995. № 5. С. 62-64.
4. Забродский П.Ф. // Иммунология. - 1996. № 4. С. 26-28.
5. Забродский П.Ф., Мандыч В.Г. Иммунотоксикология ксенобиотиков: Монография. Саратов, 2007. 420 с.
6. Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. Иммунология. Пер. с англ. М, 2000. 582 с.
7. Giebeleh I.A., Leendertse M., Florquin S., van der Poll T. // Eur. Respir. J. 2009. Vol. 33, №2. P. 375-381.
8. Hauber H.P., Zabel P. // Internist. (Berl.). // J. Immunol. 2009. Vol. 50, №7. P. 779-780, 782-784, 786-786.
9. Kessler W., Traequer T., Westerholt A. et al. // Langenbecks Arch. Surg. 2006. Vol. 391, №2. P. 83-87.
10. Liu C., Shen F.M., Le Y.Y.// Crit. Care Ned. 2009. Vol. 37, №2. P. 778-779.
11. Oke S.L., Tracey K.J. // J. Leukoc. Biol. 2008. Vol. 83, №3. P. 512-517.
12. Pavlov V.A.// Int. J. Clin. Med. 2008. Vol. 1, №3. P. 203-212.
13. Rosas-Ballina M., Tracey K.J. // J.Intern. Med.-2009. Vol. 265, №6.P. 663-679.
14. Song D.J., Huanq X.Y., Ren L.C. et al. // Zhonghua Shao Shang Za Zhi. 2009. Vol. 25, №1. P. 36-41.
15. Vos A.F. de, Pater J.M., Pangaart P.S. van den et al. // J. Immunol. 2009. Vol. 183, №1. P. 533-542.