

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2003

УДК [616.731:612.215].014.46+615.357.45.015

А.Н.Федин, М.М.Нур, А.И.Кривченко, К.Г.Сурков¹

ВЛИЯНИЕ ДЕКСАМЕТАЗОНА НА АЦЕТИЛХОЛИНОВЫЕ И ГИСТАМИНОВЫЕ РЕАКЦИИ ГЛАДКОЙ МЫШЦЫ ТРАХЕИ И БРОНХОВ КРЫСЫ

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М.Сеченова РАН;
¹ ЗАО "АСГЛ — Исследовательские лаборатории"

INFLUENCE OF DEXAMETHASONE ON ACETYLCHOLINE AND HISTAMINE RESPONSE OF SMOOTH MUSCLES OF RAT TRACHEA AND BRONCHI

A.N.Fedin, M.M.Nur, A.I.Krivchenko, K.G.Surkov

Summary

We searched dexamethasone influence on isolates of rat trachea and large bronchi under its short-term application. Dexamethasone 10^{-7} – 10^{-5} g/ml did not change the exogenous acetylcholine-induced or histamine-induced smooth muscle basal tonus and contractility, but it decreased muscle responses to electric stimulation of nerve fibers and smooth muscle cells. The most response reduction (up to $76.0 \pm 4.7\%$) was noted under the stimulation of pre-ganglionic nerve fibers. The dexamethasone concentration of 10^{-6} g/ml reduced the muscle responses caused by stimulation of the nerve fibers. The greatest changes were observed under the stimulation of the pre-ganglionic nerve fibers: $29.8 \pm 4.7\%$ for 10^{-5} g/ml of acetylcholine and $64.0 \pm 12.1\%$ for 10^{-6} g/ml of histamine. A ganglioblocker entirely removed the dexamethasone effect under the acetylcholine-induced stimulation of the nerve fibers. It did not influence the dexamethasone effect under the histamine-induced stimulation of the pre-ganglionic nerve fibers and decreased the reactions caused by the stimulation of the post-ganglionic nerve fibers from $75.3 \pm 6.9\%$ to $38.8 \pm 8.6\%$. Atropine wholly inhibited the dexamethasone influence on the drug under both types of the stimulation with acetylcholine or histamine application. We concluded that the elimination of bronchospasm resulted from the short-term application of dexamethasone is due not to its direct effect on the smooth muscle cells but to its interaction with the epithelial tracheobronchial receptors. This reaction is realised with different nervous ways under the exogenous acetylcholine or histamine.

Резюме

Изучали влияние дексаметазона на изолированные препараты трахеи и крупных бронхов крысы при его кратковременном применении. Показано, что дексаметазон в концентрации 10^{-7} – 10^{-5} г/мл не изменял базального тонуса и величины сокращений мышцы, вызванных экзогенным ацетилхолином или гистамином, но снижал мышечные ответы, вызванные стимуляцией электрическим полем нервных волокон или гладкомышечных клеток. Наибольшее снижение ответов (до $76,0 \pm 4,7\%$) наблюдалось при стимуляции преганглионарных нервных волокон. Концентрация, равная 10^{-6} г/мл дексаметазона, уменьшала ответы мышцы, вызванные стимуляцией нервных волокон. Наибольшие изменения наблюдались при стимуляции преганглионарных нервных волокон и составляли на фоне 10^{-5} г/мл ацетилхолина $29,8 \pm 4,7\%$ и на фоне 10^{-6} г/мл гистамина $64,0 \pm 12,1\%$. Ганглиоблокатор полностью снимал эффект дексаметазона при стимуляции нервных волокон на фоне ацетилхолина. На фоне гистамина ганглиоблокатор не влиял на эффект дексаметазона при стимуляции преганглионарных нервных волокон и снижал с $75,3 \pm 6,9$ до $38,8 \pm 8,6\%$ ответы, вызванные стимуляцией постганглионарных нервных волокон. Атропин полностью снимал действие дексаметазона на данный препарат при обоих видах стимуляции на фоне аппликации ацетилхолина или гистамина. Заключение, что снятие бронхоспазма при кратковременной аппликации дексаметазона происходит не за счет действия его непосредственно на гладкомышечные клетки, а в результате взаимодействия с трахеобронхиальными

рецепторами, расположенными в эпителии. Пути реализации этого действия на фоне экзогенных ацетилхолина и гистамина осуществляются по разным местным рефлекторным дугам.

При аллергических заболеваниях, в частности при бронхиальной астме, нарушено нормальное функционирование холинергической и гистаминергической систем в дыхательных путях. Для лечения этих заболеваний часто применяются стероидные гормоны. Эти гормоны обладают широким спектром действия, оказывая влияние на многие структуры дыхательных путей, в том числе и на медиаторные системы. Отмечено, что введение крысам дексаметазона в течение 1–8 дней увеличивало число β -адренорецепторов [9] и снижало десенситизацию β_2 -адренорецепторов к агонистам [14], что свидетельствовало об участии кортикостероидов в регуляции адренергических путей. Глюкокортикостероиды могут снимать бронхоспазм посредством изменения концентрации мускариновых холинорецепторов на гладкой мышце [13]. Установлено, что у собак, обработанных в течение 3 дней метилпреднизолоном, уменьшалось количество M_2 - и M_3 -мускариновых рецепторов в гомогенате гладкомышечных клеток дыхательных путей [6]. Кроме того, дексаметазон тормозит увеличение внутриклеточного кальция, вызванное гистамином, действуя через H_1 -рецепторы гладкомышечных клеток [8]. Во всех перечисленных работах рассматривалось взаимодействие глюкокортикостероидов с рецепторами гладкомышечных клеток. Однако, холино- и адренорецепторы присутствуют и на нейронах интрамуральных ганглиев. К сожалению, роль последних при действии глюкокортикостероидов на дыхательные пути не учитывалась. Перед нами стояла задача определить значение нейронов интрамуральных ганглиев при действии глюкокортикостероидов на мышечные ответы дыхательных путей, вызванные аппликацией ацетилхолина или гистамина.

Материалы и методы

Опыты проводили на 38 белых беспородных крысах массой 150–240 г. Изолированные сегменты трахеи и крупных бронхов помещали в термостатированную камеру ($37 \pm 0,5^\circ\text{C}$) с проточным аэрированным раствором Кребса–Хензелейта. Электромеханическим датчиком смещений регистрировали сокращения гладкой мышцы, вызванные стимуляцией электрическим полем и фармакологическими веществами. Частота стимулов составляла 10 и 30 стим/с, длительность — 0,4 и 4,0 мс и амплитуда — 15 В. Продолжительность раздражения 10 с. Применяя стимулы разной длительности, можно выборочно стимулировать нервные волокна или мышечные клетки. Короткие стимулы до 0,5 мс способны активировать преимущественно преганглионарные (10 стим/с) или постганглионарные (30 стим/с) нервные волокна. Стимулы большой длительности (более 1,0 мс) наряду с раздражением нервов активируют непосредственно мышечные клетки, ответ в этом случае определяется главным образом возбуждением самой

мышцы. В опытах изучали реакции сегментов дыхательных путей на ацетилхолин, гистамин, дексаметазон, атропин и ганглиоблокатор ИЭМ-1678. Растворы веществ перфузировали через экспериментальную камеру в течение 10 мин. Скорость перфузии 1 мл/мин. Подробное описание методики опубликовано ранее [3].

Результаты исследования

Проведенные эксперименты показали, что дексаметазон в концентрации 10^{-7} – 10^{-5} г/мл достоверно ($p < 0,05$) не изменял базального тонуса гладкой мышцы трахеи и крупных бронхов крысы. В то же время это вещество оказывало влияние на мышечные ответы, вызванные стимуляцией электрическим полем пост-, преганглионарных нервных волокон или непосредственно гладкомышечных клеток. Прежде всего необходимо отметить, что глюкокортикостероид двухфазно изменял амплитуду сокращения мышцы. Первая фаза характеризовалась усилением ответа, вторая — его снижением (рис.1). Различий в ответах между сегментами грудной части трахеи и крупных бронхов не обнаружено. Максимальное увеличение ответа до $126,0 \pm 5,5\%$ наблюдалось при действии дексаметазона в концентрации 10^{-5} г/мл и при стимуляции преганглионарных нервных волокон. Наименьшие изменения сократительной активности сегментов имели место при стимуляции непосредственно мышечных волокон. Достоверная дозозависимая реакция гладкой мышцы на дексаметазон наблюдалась только при

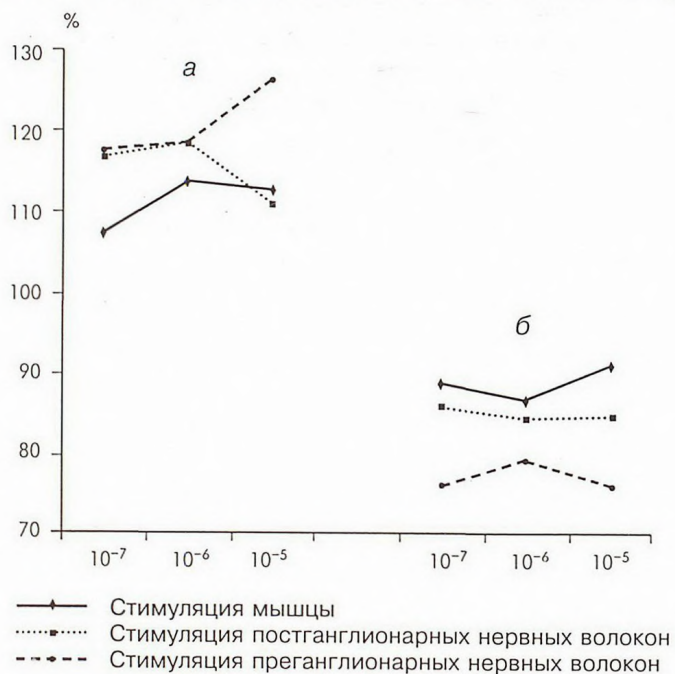


Рис.1. Усиление (а) и снижение (б) сокращения мышцы трахеи крысы, вызванное стимуляцией электрическим полем при действии дексаметазона.

По оси абсцисс — концентрация дексаметазона (в г/мл); по оси ординат — изменение сокращений мышцы (в %).

стимуляции преганглионарных нервных волокон. Вторая фаза действия дексаметазона связана со снижением амплитуды сокращения мышцы. Величина снижения ответов не зависела от концентрации вещества при всех видах стимуляции, но зависела от вида стимуляции и достигала наибольшего значения ($76,0 \pm 4,7\%$) при стимуляции преганглионарных нервных волокон (см. рис.1).

Кроме изменения амплитуды сокращения, дексаметазон в концентрации 10^{-7} г/мл достоверно ($p < 0,05$) увеличивал величину расслабления мышцы. Наибольшее расслабление с $14,3 \pm 6,0$ до $36,9 \pm 7,9$ мг отмечалось опять же при стимуляции преганглионарных нервных волокон.

Как уже говорилось выше, дексаметазон взаимодействует с холино- и гистаминчувствительными структурами дыхательных путей, поэтому в дальнейшем мы проанализировали влияние дексаметазона на мышечную активность при стимуляции электрическим полем мышечных волокон, пост- или преганглионарных нервных волокон на фоне экзогенно-апплицированных ацетилхолина и гистамина.

Перфузия ацетилхолина через камеру с препаратом трахеи или бронхов вызывала дозозависимое сокращение гладкой мышцы. Дексаметазон в концентрации 10^{-7} – 10^{-6} г/мл уменьшал эффект ацетилхолина на 13–20% и незначительно смещал кривую доза–эффект для ацетилхолина вправо.

На фоне высокого тонуса гладкой мышцы, вызванного большими (10^{-3} – 10^{-4} г/мл) концентрациями

ацетилхолина, ответы сегментов трахеи и бронхов на стимуляцию электрическим полем либо отсутствовали, либо имели незначительную величину. Дексаметазон в диапазоне этих концентраций ацетилхолина практически не оказывал влияния на величину мышечных ответов. На фоне ацетилхолина в концентрации 10^{-5} – 10^{-7} г/мл при стимуляции препаратов электрическим полем имело место двухфазное изменение ответов. На 1-й минуте перфузии ацетилхолина (а при низких концентрациях и на 3-й минуте) вызванные стимуляцией ответы потенцировались. При более длительной перфузии ответы уменьшались. Глюкокортикоидный препарат в концентрации 10^{-7} – 10^{-5} г/мл не оказывал достоверного влияния на мышечные ответы, вызванные стимуляцией мышечных или постганглионарных нервных волокон на фоне ацетилхолина. Кроме того, он не изменял величины максимального сокращения мышцы при стимуляции преганглионарных нервных волокон. В то же время дексаметазон достоверно усиливал снижение ответов, вызванных стимуляцией преганглионарных нервных волокон, на фоне ацетилхолина 10^{-5} – 10^{-7} г/мл. Наибольшее снижение до $29,8 \pm 4,7\%$ наблюдалась при перфузии ацетилхолина в концентрации 10^{-5} г/мл и дексаметазона в концентрации 10^{-6} г/мл (рис.2).

Таким образом, дексаметазон оказывал достоверное влияние на мышечные ответы дыхательных путей крысы, вызванные главным образом стимуляцией преганглионарных нервных волокон. Необходимо отметить, что на величину максимального сокращения мышцы дексаметазон оказывал влияние только при эндогенном выделении ацетилхолина. Когда потенцирование мышечных ответов при стимуляции вызывалось экзогенным предъявлением ацетилхолина, дексаметазон практически не влиял на амплитуду максимального сокращения. В то же время дексаметазон снижал амплитуду сокращения в обоих случаях. Можно предположить, что механизмы действия глюкокортикоида в момент нарастания сокращения и его спада различны.

Гистамин в концентрации 10^{-8} – 10^{-4} г/мл лишь незначительно увеличивал тонус гладкой мышцы трахеи и крупных бронхов крысы. Наибольшее увеличение тонуса наблюдалось при концентрации гистамина 10^{-6} г/мл и составляло $150,8 \pm 28,3$ мг, или $122,8 \pm 5,9\%$ от исходной величины. Дексаметазон достоверно ($p < 0,05$) и практически на одну и ту же величину (47–96 мг) снижал тонус гладкой мышцы на всем диапазоне использованных концентраций гистамина. Необходимо отметить, что отсутствовала зависимость величины снижения тонуса от концентрации глюкокортикоида.

Дексаметазон в концентрации 10^{-7} и 10^{-5} г/мл достоверно ($p < 0,05$) не изменял величины сокращения мышцы трахеи и крупных бронхов при всех видах стимуляции на фоне гистамина в концентрации 10^{-8} – 10^{-4} г/мл (рис.3). В то же время дексаметазон в концентрации 10^{-6} г/мл снижал величину мышечного ответа и это снижение зависело от типа стиму-

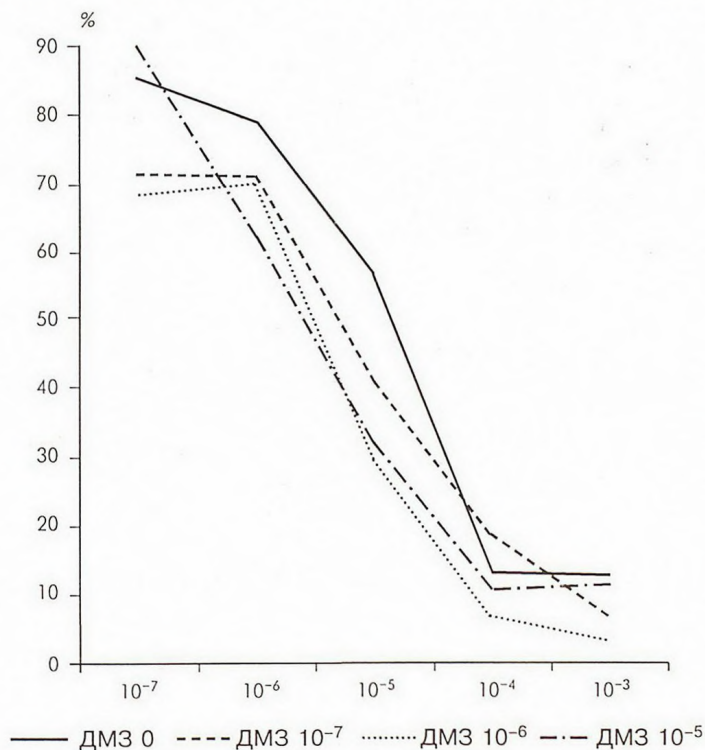


Рис.2. Влияние дексаметазона на сокращения мышцы трахеи крысы, вызванные стимуляцией преганглионарных нервных волокон, на фоне ацетилхолина.

По оси абсцисс — концентрация ацетилхолина (в г/мл); по оси ординат — изменения сокращений мышцы (в %); ДМЗ — дексаметазон.

ляции. Наибольшее уменьшение амплитуды сокращения до $64,0 \pm 12,1\%$ наблюдалось при стимуляции преганглионарных нервных волокон.

Таким образом, наиболее эффективная концентрация дексаметазона при действии на изолированные препараты трахеи и крупных бронхов крысы составляла 10^{-6} г/мл. Наибольшие изменения, связанные со снижением величины сокращения гладкой мышцы, имеют место при стимуляции преганглионарных нервных волокон. Можно предположить, что кроме известных механизмов действия глюкокортикоидов эффект дексаметазона связан с влиянием на преганглионарные нервные структуры и он опосредован участием нейронов интрамуральных ганглиев. Для уточнения этого предположения была проведена серия экспериментов с применением ганглиоблокатора и блокатора нервно-мышечной передачи атропина.

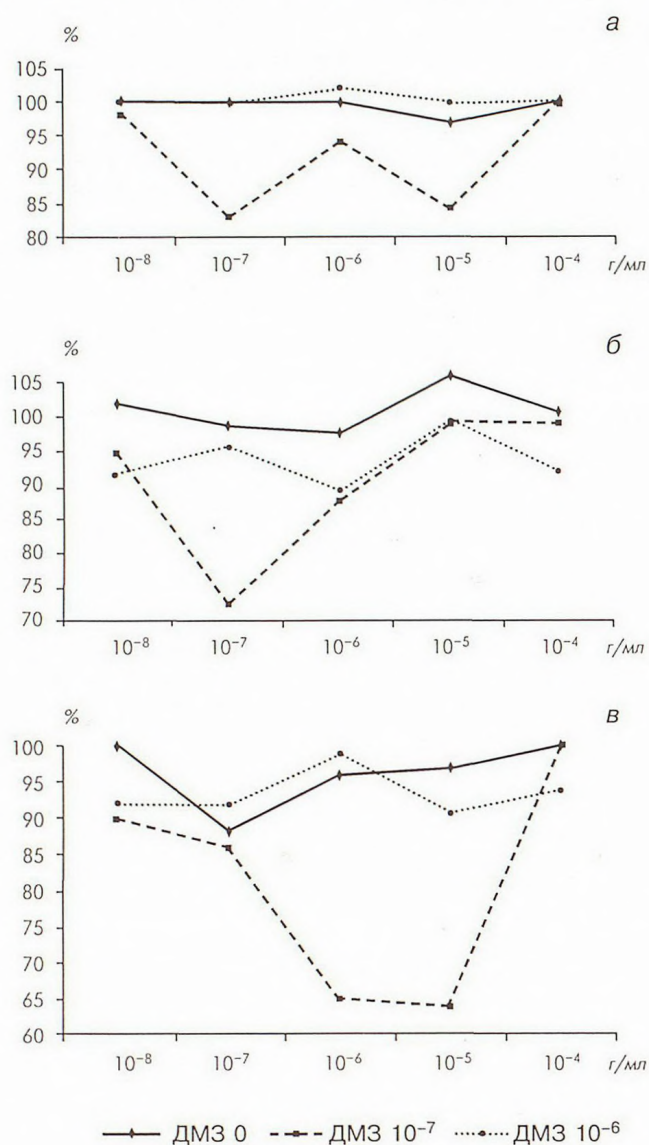


Рис.3. Влияние дексаметазона на сокращения мышцы трахеи крысы, вызванные стимуляцией мышечных клеток (а), постганглионарных (б) и преганглионарных (в) нервных волокон на фоне гистамина.

По оси абсцисс — концентрация гистамина. По оси ординат — изменения сокращения (в %); за 100% принята величина сокращения гладкой мышцы трахеи на фоне гистамина.

Обработка препаратов трахеи и крупных бронхов ганглиоблокатором ИЭМ-1678 в концентрации 10^{-5} г/мл снижает ответы гладкой мышцы при стимуляции преганглионарных нервных волокон до $58,2 \pm 11,2\%$ и практически не изменяет величину ответов при стимуляции постганглионарных нервных волокон ($93,6 \pm 5,7\%$). Ганглиоблокатор полностью снимает эффект дексаметазона при стимуляции пре- или постганглионарных нервных волокон на фоне ацетилхолина концентрации 10^{-5} г/мл (рис.4). На фоне гистамина 10^{-6} г/мл ганглиоблокатор также снимал мышечные ответы, вызванные стимуляцией преганглионарных нервных волокон, и снижал с $75,3 \pm 6,9\%$ до $38,8 \pm 8,6\%$ ответы, вызванные стимуляцией постганглионарных нервных волокон.

Обработка препаратов дыхательных путей блокатором нервно-мышечной передачи атропином в концентрации $5 \cdot 10^{-8}$ г/мл снижала ответы гладкой мышцы при стимуляции пре- и постганглионарной стимуляции на фоне аппликации ацетилхолина или гистамина до 16–30%. Различия в действии атропина на препараты трахеи при аппликации ацетилхолина или гистамина не обнаружены (рис.4). Атропин полностью снимал действие дексаметазона на данный препарат при обоих видах стимуляции на фоне аппликации ацетилхолина или гистамина.

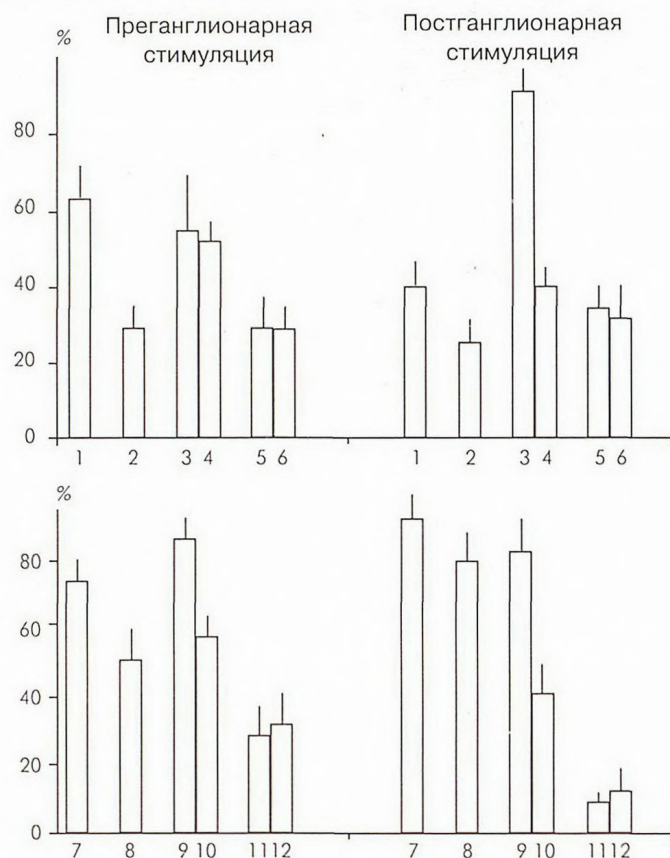


Рис.4. Изменение ответов гладкой мышцы трахеи крысы под влиянием ацетилхолина (АХ), гистамина (ГА), дексаметазона (ДМЗ), ганглиоблокатора (ИЭМ), блокатора нервно-мышечной передачи (АТР) и их совместном действии.

По оси абсцисс: 1 — АХ; 2 — АХ+ДМЗ; 3 — ИЭМ; 4 — АХ+ДМЗ+ИЭМ; 5 — АТР; 6 — АХ+ДМЗ+АТР; 7 — ГА; 8 — ГА+ДМЗ; 9 — ИЭМ; 10 — ГА+ДМЗ+ИЭМ; 11 — АТР; 12 — ГА+ДМЗ+АТР.

Обсуждение результатов

Полученные результаты показали, что при данных экспериментальных условиях, заключающихся главным образом в кратковременной аппликации глюкокортикоида на препараты трахеи и бронхов (10–15 мин), дексаметазон не вызывал изменения базального тонуса гладкой мышцы и величины тонических сокращений мышцы, вызванных экзогенным ацетилхолином или гистамином. По данным литературы [4,7,8], препараты культуры гладкомышечных клеток обычно инкубировали в растворе дексаметазона в течение 20–48 ч. Короткое время предъявления дексаметазона объясняется нашей задачей — выяснение механизмов быстрого снятия бронхоспазма кортикостероидами при лечении бронхиальной астмы. Как следует из наших экспериментов, снятие бронхоспазма при кратковременной аппликации дексаметазона происходит, вероятно, не за счет действия глюкокортикоидов непосредственно на гладкомышечные клетки, а в результате взаимодействия с другими структурами и механизмами.

Анализируя результаты влияния дексаметазона на ответы сегментов при блокаде нервно-мышечной передачи, можно сказать, что действие кортикостероида связано со структурами, лежащими выше постганглионарных нервных волокон. Это справедливо при аппликации ацетилхолина и гистамина. Но обработка препаратов ганглиоблокатором выявляет различие в действии дексаметазона на фоне ацетилхолина и гистамина. В первом случае ганглиоблокатор снимает эффект дексаметазона при преганглионарной и постганглионарной стимуляции нервных волокон. Поэтому можно предположить, что дексаметазон оказывает влияние на нервные структуры, лежащие выше эфферентного нейрона, вызывающего возбуждение гладкой мышцы, и связанные с эфферентным нейроном холинергической синаптической передачей. Во втором случае ганглиоблокатор практически не оказывает влияния на действие дексаметазона при стимуляции преганглионарных нервных волокон и усиливает эффект глюкокортикоида при стимуляции постганглионарных нервных волокон. Исходя из этих фактов, можно предположить, что дексаметазон оказывает влияние на нервные структуры, лежащие выше эфферентного нейрона, но связанные с ним нехолинергической синаптической передачей. Возможно, что в наших экспериментах дексаметазон оказывает влияние на одни и те же структуры, но пути реализации его действия при экзогенном предъявлении ацетилхолина или гистамина могут быть разными. Такой структурой могут быть трахеобронхиальные рецепторы, расположенные в эпителии. Нервные волокна чувствительных нейронов быстро адаптирующихся рецепторов направляются к эффекторным нейронам, вызывающим возбуждение гладкой мышцы. Это 2-нейронная местная рефлекторная дуга. Нервные волокна от сенсорных нейронов медленно-адаптирующихся рецепторов на-

правляются к нейронам генератора ритма, затем, возможно, через вставочные клетки к эффекторным нейронам [2]. Это полинейронная местная рефлекторная дуга. Гистамин активирует трахеобронхиальные рецепторы [1,10,11]. Медиатором чувствительных нейронов являются нейрокинины — субстанция Р [5,12]. Поэтому ганглиоблокатор прерывает только полинейрональный путь, содержащий межнейронную холинергическую передачу.

Можно заключить, что действие дексаметазона на мышечные ответы, вызванные стимуляцией пре- или постганглионарных нервных волокон, на фоне ацетилхолина или гистамина неодинаковое. Действие глюкокортикоида более выражено на преганглионарное нервное звено, чем на постганглионарное и, тем более непосредственно на мышцу. Кроме описанных в литературе точек действия дексаметазона в дыхательных путях, можно добавить еще трахеобронхиальные рецепторы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Федин А.Н., Алиева Е.В., Ноздрачев А.Д. Реакции гладкой мышцы трахеи на гистамин. Рос. физиол. журн. 1997; 83 (7): 102–108.
2. Федин А.Н. Медиаторы местной рефлекторной дуги в дыхательных путях крысы и морской свинки. Рос. физиол. журн. 1998; 84 (4): 330–336.
3. Шопотов И.К., Федин А.Н., Кривченко А.И. Ответы гладкой мышцы трахеи крысы на ацетилхолин и электрическую стимуляцию. Физиол. журн. СССР 1991; 77 (3): 133–137.
4. Calvet J.H., D'Ortho M.P., Jarreau P.H. et al. Glucocorticoids inhibit sulfur mustard-induced airway muscle hyperresponsiveness to substance P. J. Appl. Physiol. 1994; 77 (5): 2325–2332.
5. Colledge H.M., Colledge J.C.G. Airway axon reflexes — where now? News Physiol. Sci. 1995; 10: 91–96.
6. Emala C.W., Clancy J., Hirshman C.A. Glucocorticoid treatment decreases muscarinic receptor expression in canine airway smooth muscle. Am. J. Physiol. 1997; 272 (4, pt 1): L745–L751.
7. Florio C., Flesar M., Martin J.G., Heisler S. Identification of adenylate cyclase-coupled histamine H₂ receptors in guinea pig smooth muscle cells in culture and effect of dexamethasone. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 1992; 7 (6): 582–589.
8. Hardy E., Farahani M., Hall I.P. Regulation of histamine H₁ receptor coupling by dexamethasone in human cultured airway smooth muscle. Br. J. Pharmacol. 1996; 118 (4): 1079–1084.
9. Mak J.C., Nishikawa M., Shirasaki H. et al. Protective effects of a glucocorticoid on downregulation of pulmonary β_2 -adrenergic receptors in vivo. J. Clin. Invest. 1995; 96 (1): 99–106.
10. Matsumoto S., Nagayama T., Yamasaki M. et al. Cholinergic and H₁-receptor influences of histamine on slowly adapting pulmonary stretch receptor activity in the rabbit. J. Auton. Nerv. Syst. 1992; 40 (2): 107–120.
11. Matsumoto S., Kanno T., Yamasaki M. et al. H₁- and H₂-receptor influences of histamine and ammonia on rapidly adapting pulmonary stretch receptor activities. J. Auton. Nerv. Syst. 1993; 43 (1): 17–25.
12. Myers A.C., Undem B.J. Electrophysiological effects of tachikins and capsaicin on guinea pig bronchial parasympathetic ganglion neurons. J. Physiol. (Lond.) 1993; 470: 665–679.
13. Nabishah B.M., Morat P.B., Kadir B.A., Khalid B.A.K. Effect of steroid hormones on muscarinic receptors of bronchial smooth muscle. Gen. Pharmacol. 1991; 22 (2): 389–392.
14. Seco A.J., Salgueiro M.E. et al. Acute and chronic treatment with glucocorticosteroids, modifying the β_2 -adrenergic response of the guinea pig trachea. Lung 1995; 173 (5): 321–328.

Поступила 15.07.99