

УДК 612.884:611.16

А.Ю. НЕЖУТА, Е.И. ИВАНОВА, Е.А. КОНДРАТЕНКОВА,  
Т.Б. МЕЛИК-КАСУМОВ, В.С. УЛАЩИК

## МОДУЛЯЦИЯ КАННАБИНОИДАМИ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ВИСЦЕРАЛЬНЫХ НЕРВОВ В НОРМЕ И ПРИ ПОВЫШЕННОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА В ТОЛСТОМ КИШЕЧНИКЕ\*

*В статье приведены данные о вовлечении каннабиноидных рецепторов в рефлекторную регуляцию деятельности желудочно-кишечного тракта и механизмы модуляции функционирования селезенки как иммунного органа. Показано, что предварительная блокада каннабиноидных рецепторов приводит к изменению частоты афферентной и эфферентной импульсации в брюшноаортальных нервах в ответ на эндотоксин. Экспериментально доказано, что инфузия анандамида в ободочную кишку сопровождается рефлекторным усилением эфферентного притока к селезенке, а предварительное введение антагониста каннабиноидных рецепторов отменяет эффекты липополисахарида на симпатическую эфферентную импульсацию в селезеночном нерве.*

В кишечнике здорового человека содержится более 400 видов аутохтонных микроорганизмов, продукты жизнедеятельности которых могут изменять активность чувствительных окончаний афферентных волокон, иннервирующих кишку. Видовой и количественный состав естественной микрофлоры желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) отличается в разных его отделах и характеризуется краинио-каудальным градиентом [1, 2]. Основным представителем микрофлоры дистальных отделов кишечника является кишечная палочка *Escherichia coli*. Компонент ее бактериальной стенки – липополисахарид (ЛПС) – в низких концентрациях является стимулятором иммунных ответов [1, 2]. Повышение концентрации ЛПС в кишке и последующая его транслокация в кровоток в ряде случаев могут приводить к развитию патологических состояний вплоть до сепсиса [3]. Современная литература располагает свидетельствами того, что каннабиноидные рецепторы СВ-1, обнаруженные в симпатических ганглиях и на нервных терминалах ЖКТ, что СВ-2-рецепторы, экспрессируемые иммунными клетками этого органа, вовлечены в модуляцию развития воспалительных процессов различной, в том числе и кишечной, этиологии [4-6].

Общим свойством СВ1 и СВ2-рецепторов является способность модулировать спонтанное или индуцированное выделение химических мессенджеров [7]. Установлено, что пресинаптические СВ1-рецепторы в активированном состоянии участвуют в подавлении высвобождения таких нейротрансмиттеров, как ацетилхолин, норадреналин, холицистокинин, глутамат, у-аминомасляная кислота и т.д. [7-9]. Роль СВ2-рецепторов еще не выяснена до конца, однако известно, что они действуют как супрессоры выделения противовоспалительных цитокинов иммунными клетками и модулируют высвобождение противовоспалительных цитокинов [7-9]. Установлено также, что повышение концентрации ЛПС в крови является стимулом для синтеза клетками различных тканей эндогенных лигандов каннабиноидных рецепторов, глав-

\* Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант Б06М-134).

ным образом анандамида (АЕА) и 2-арахидоноил глицерола [10]. Данные лиганды, взаимодействуя с нервными окончаниями периферических нервов, способны модулировать их электрическую активность [11, 12]. Показано, что инфузия АЕА в полость нисходящей ободочной кишки сопровождается кратковременным (в течение 5-10 минут после инфузии) незначительным увеличением частоты центростремительных импульсов в волокнах брюшноаортального нерва (иннервирующего толстый кишечник), которое затем сменялось постепенным понижением этого показателя [11]. Приведенные факты согласуются также с результатами, полученными Calingano A. et al. (1997) и Izzo A.A. et al. (1999), о том, что агонисты каннабиноидных рецепторов способны ослаблять моторику тонкого кишечника и замедлять опорожнение желудка [13]. В то же время в литературе отсутствуют данные о влиянии эндогенных лигандов каннабиноидных рецепторов на импульсацию в чувствительных и эфферентных нервных проводниках ЖКТ (как и в других висцеральных органах) на фоне повышенной концентрации ЛПС в организме.

**Целью** данного исследования явилось выяснение особенностей влияния лигандов каннабиноидных рецепторов на электрическую активность проводников брюшноаортального и селезеночного нервов при повышении внутрикишечной концентрации ЛПС.

### Материалы и методы исследования

Экспериментальный материал получен в острых опытах на белых крысах-самцах массой 250-300 г. Анестезию осуществляли путем внутрибрюшинного введения тиопентала натрия (70 мг/кг). Животным производили вскрытие брюшной полости по средней линии, затем помещали на правый бок и делали боковой разрез левой части стенки живота на уровне последней реберной дуги. Крысы находились в вентилируемом термостате, температуру которого постоянно поддерживали на уровне +28°C – +30°C. Исследуемый участок кишечника извлекали из брюшной полости и размещали на термостабилизированном столике (+37°C). Регистрировали афферентную импульсацию в периферических концах брюшноаортальных нервов, в составе которых проходят волокна, иннервирующие толстый кишечник. Симпатическую эфферентную импульсацию (СЭИ) регистрировали в центральных концах указанного нерва. Требуемые для опытов нервные стволы отделяли от близлежащих тканей на протяжении 1,5-2-х см, перерезали и брали на лигатуру. Использовали подвесные хлорсеребряные электроды с межэлектродным расстоянием 2 мм. В связи с длительной регистрацией импульсации (до 1,5 часов) исследуемая нервная ветвь во избежание подсыхания покрывалась вместе с отводящим электродом смесью вазелинового масла и парафина. Автоматическое квантование сигнала производилось каждые 5 минут в течение часа до введения первого препарата и часа после инфузии последнего.

В экспериментах использовались следующие вещества: анандамид (лиганд каннабиноидных рецепторов) производства фирмы Sigma Aldrich, USA) в дозе 0,2 мг/кг, растворенный в 0,3 мл раствора этилового спирта (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH, 30%); AM 281 (антагонист каннабиноидных рецепторов (Sigma Aldrich, USA)) в дозе 0,2 мг/кг, растворенный в 0,3 мл раствора, содержащего этиловый спирт (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH, 30%), Tween 80 и изотонический раствор NaCl (0,9%) (1:1:8); липополисахарид (ЛПС) *E. coli* (Sigma Aldrich, USA) в дозе 10 мкг, растворенный в 0,3 мл изотонического раствора NaCl, которые инфузировали в просвет нисходящей ободочной кишки через введенный предварительно тонкий силиконовый катетер (диаметр 0,5 мм, длина 20 см).

Комплекс оборудования для регистрации импульсации в нерве включал усилитель переменного тока с частотным диапазоном от 10 Гц до 3 кГц, осциллограф С1-83, аналого-цифровой преобразователь и компьютер "Pentium-166 MMX". Обработка и анализ данных производились с помощью специальных программ, разработанных в Институте физиологии НАН Беларуси. Все полученные данные статистически обработаны с использованием *t*-критерия Стьюдента.

### Результаты

Предварительно в контрольных сериях экспериментов было установлено, что внутрикишечная инфузия каждого из указанных выше растворителей вызывала незначительное увеличение частоты центростремительной импульсации в брюшноаортальных нервах, однако в обоих случаях наблюдаемые изменения не носили достоверного характера [11].

Реакции чувствительных проводников брюшноаортального нерва на введение АЕА и АМ 281 также изучены авторами ранее [11].

Экспериментальные данные показали (рис. 1, А), что в отличие от инфузии АЕА в ободочную кишку, введение 10 мкг ЛПС в тот же участок ЖКТ влечет за собой увеличение частоты афферентных разрядов в волокнах брюшноаортальных нервов с латентным периодом 5–10 минут. К 15–20-й минуте после введения изменения становились достоверными ( $P < 0,05$ ). К 30–35-й минуте афферентная импульсация была на  $29,2 \pm 3,2$  % выше фоновой и оставалась повышенной до конца наблюдения (в течение последующих 25–30 минут).

имп/с

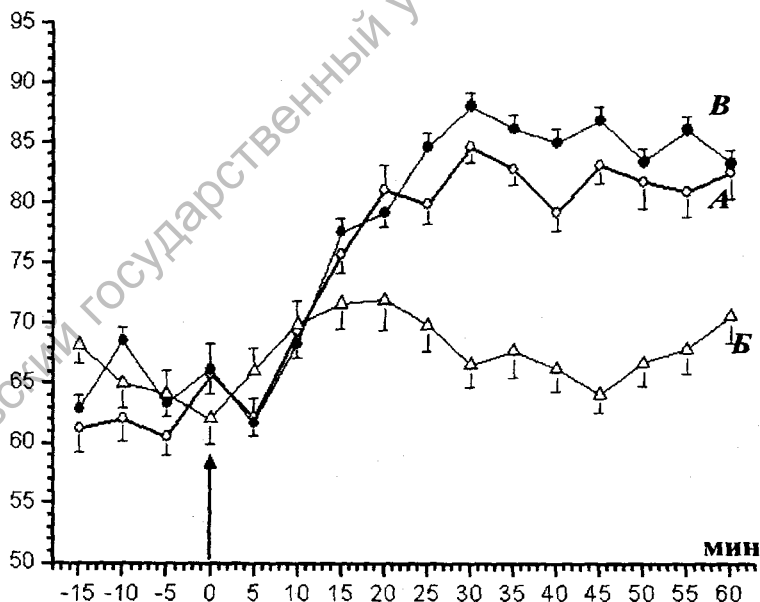


Рис. 1

Изменения частоты афферентной импульсации в брюшноаортальном нерве в ответ на ЛПС (А,  $n = 5$ ), а также в ответ на введение этого препарата на фоне предварительной инфузии:

Б — АЕА ( $n = 5$ ), растворенного в 0,3 мл 30%-го этилового спирта,

В — АМ 281 ( $n = 5$ ). Стрелкой указан момент введения ЛПС

Как показано на рисунке 1 (Б), предварительная (за 20 минут) инфузия АЕА в указанный участок кишечника подавляла вызванную ЛПС стимуляцию чувствительных проводников изучаемого нерва, тогда как введение блокатора каннабиноидных рецепторов АМ 281, наоборот, приводило к более выраженному (максимально на  $34,3 \pm 4,1\%$  по отношению к фону) увеличению частоты афферентной импульсации (рис. 1, В). Латентный период реакции составил 5-10 минут.

В предыдущих экспериментах было показано, что ЛПС, инфузирванный в дозе 10 мкг в ободочную кишку крысы, вызывает рефлекторное усиление активности симпатических эфферентных волокон брюшноаортального нерва [15]. Введение АЕА в исследуемый участок кишки также приводит к достоверному ( $P < 0,05$ ) повышению интенсивности СЭИ в указанном нерве здоровых крыс (что предположительно приводит к ослаблению пропульсивной двигательной активности ободочной кишки), тогда как инфузия АМ 281 не вызывала развития достоверных изменений СЭИ [11]. Учитывая вышесказанное, на следующем этапе исследования изучались особенности рефлекторных изменений частоты СЭИ в ответ на ЛПС, введенный в кишку на фоне заблаговременной (за 20 минут) инфузии АЕА или АМ 281.

Предварительная инфузия АЕА не отменяла стимулирующего СЭИ эффекта ЛПС и не оказывала значительного влияния на выраженность вызванных эндотоксином изменений импульсации в симпатических эфферентных проводниках (рис. 2, А).

Заблаговременная блокада каннабиноидных рецепторов с помощью АМ 281 приводила к инверсии реакции на эндотоксин, а именно к резкому значительному понижению частоты СЭИ в указанном нерве через 5-10 минут после внутрикишечной инфузии ЛПС. Максимально низких значений (на  $54,4 \pm 2,1\%$  ниже фонового уровня) частота СЭИ достигала к 25-30-й минуте после инфузии ЛПС и оставалась на таком уровне в течение последующих 45-50 минут (рис. 2, Б).

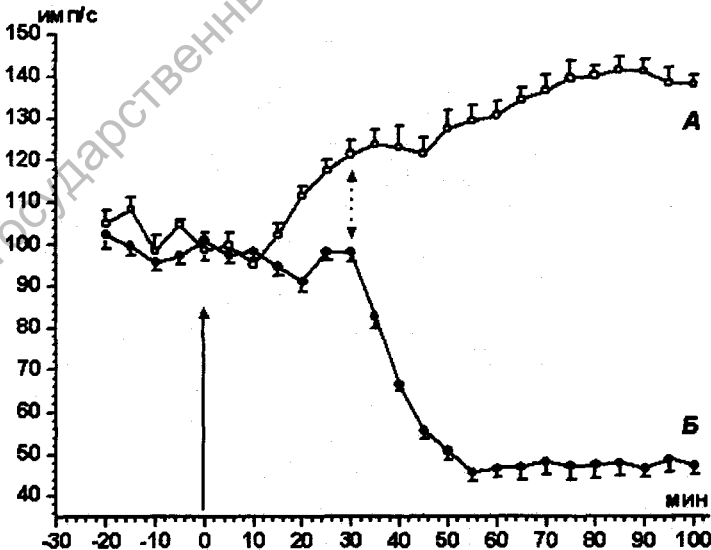


Рис. 2

Изменения частоты симпатической эфферентной импульсации в брюшноаортальных нервах в ответ на ЛПС на фоне предварительного введения: А - АЕА ( $n = 5$ ), растворенного в 0,3 мл 30%-го этилового спирта, Б - АМ 281 ( $n = 4$ ). Непрерывной стрелкой указан момент введения АЕА или АМ281, пунктирной стрелкой - момент введения ЛПС

Спонтанная активность эфферентных волокон селезеночного нерва, как установлено [16, 17], представлена относительно высокочастотной (более 100-110 импульсов в секунду) импульсацией, паттерн которой образован пачками (залпами) высокоамплитудных импульсов и нерегулярными отдельными межзалповыми потенциалами. Известно, что внутрикишечное, внутрибрюшинное и внутривенное введение ЛПС вызывает рефлекторное изменение частоты СЭИ не только в кишечных нервах, но и в селезеночном нерве [16]. Показано, что изменение в ту или иную сторону интенсивности эфферентного притока к селезенке оказывает влияние на интенсивность образования Т-лимфоцитов, что в последствии сказывается на иммунной функции этого органа [17]. В литературе имеются данные и об участии каннабиноидов в модуляции ответов иммунных органов на антигены бактериального происхождения [18, 19]. В связи с этим на данном этапе проводили эксперименты, направленные на проверку предположения о том, что каннабиноиды и их рецепторы вовлечены в модуляцию деятельности селезенки как иммунного органа в условиях повышения концентрации ЛПС.

В контрольных опытах установлено, что введение специфического для АЕА растворителя в ободочную кишку приводило в течение всего времени наблюдения лишь к незначительным и недостоверным колебаниям частоты симпатической эфферентной импульсации в селезеночном нерве (рис. 3, А). Введение же в указанный участок кишечника АЕА в дозе 20 мкг через 15-20 минут с момента инъекции вызывало повышение частоты СЭИ в исследуемом нерве, которое сохранялось в течение всего последующего времени регистрации (45-50 минут) (рис. 3, Б).

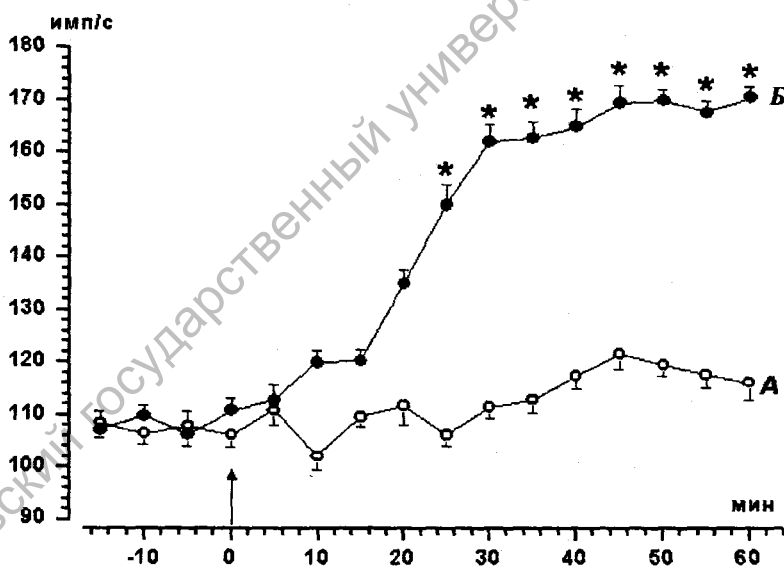


Рис. 3

Изменения частоты симпатической эфферентной импульсации в селезеночном нерве в ответ на введение: А — 0,3 мл 30%-го раствора этилового спирта ( $n = 5$ ), Б — АЕА ( $n = 5$ ), растворенного в 0,3 мл 30%-го этилового спирта. \* —  $P < 0,05$ . Стрелкой указан момент введения раствора

В более ранних экспериментах нами были получены данные о том, что инфузия ЛПС в полость ободочной кишки вызывает рефлекторные изменения активности симпатических эфферентных волокон селезеночного нерва [16].

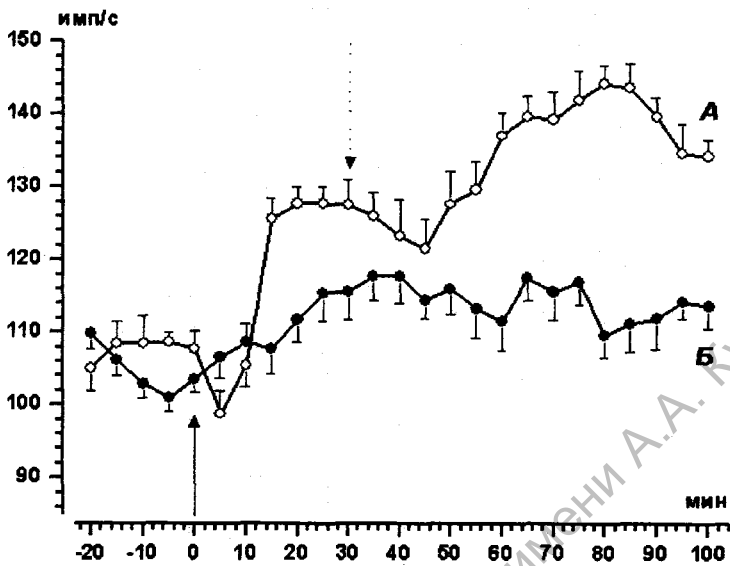


Рис. 4

Изменения частоты симпатической эфферентной импульсации в селезеночном нерве в ответ на ЛПС на фоне предварительного введения: А – АЕА (n = 5), растворенного в 0,3 мл 30%-го этилового спирта, Б – АМ 281 (n = 4). Непрерывной стрелкой указан момент введения АЕА или АМ 281, пунктирной стрелкой – момент введения ЛПС

Как показано на рисунке 4 (А), сходная динамика вызванных введением ЛПС в толстый кишечник изменений частоты СЭИ в центробежных проводниках исследуемого нерва наблюдалась и на фоне предварительного введения АЕА в тот же участок кишки.

Сразу после инфузии эндотоксина частота СЭИ недостоверно понизилась, но уже через 20-25 минут она стала постепенно увеличиваться, к 50-55-й минуте изменения этого показателя становились максимальными (на  $13 \pm 2,2\%$  выше уровня СЭИ на фоне предварительного введения АЕА и на  $33,9 \pm 2,9\%$  выше исходного уровня).

На фоне же заблаговременной блокады СВ-рецепторов с помощью АМ 281 усиления симпатического притока к селезенке не наблюдалось (рис. 4, Б). Результаты исследования в совокупности с имеющимися в литературе сведениями подтверждают предположение о существовании рефлекторного механизма влияния экзогенного ЛПС на интенсивность СЭИ в селезеночном нерве, а также свидетельствуют об участии эндоканнабиноидной системы в реализации этих рефлекторных эффектов и модуляции, таким образом, функционирования селезенки как иммунного органа.

### Заключение

Полученные данные показывают, что повышение концентрации ЛПС в полости ободочной кишки сопровождалось усилением активности чувствительных и эфферентных проводников брюшноаортального нерва. Введение ЛПС в полость ободочной кишки на фоне предварительной инфузии АЕА, напротив, не вызывало повышения активности афферентных волокон брюшноаортального

нерва, тогда как предварительная блокада каннабиноидных рецепторов лигандом AM 281 приводила к еще большему увеличению частоты афферентной импульсации в ответ на эндотоксин. Полученные результаты свидетельствуют о вовлечении каннабиноидных рецепторов в механизмы сигнализации об антигене в центральную нервную систему и модуляцию иммунного ответа.

Рефлекторное повышение интенсивности эфферентного притока к толстой кишке в ответ на 10 мг ЛПС обуславливает ослабление двигательной активности изучаемого участка ЖКТ. Предварительное введение АЕА не изменяло выраженность и направленность индуцированных ЛПС реакций, тогда как проведенная заранее фармакологическая блокада СВ-рецепторов приводила к инверсии ответов на ЛПС. Приведенные выше факты в совокупности позволяют предположить, что СВ-рецепторы вносят вклад в рефлекторную регуляцию деятельности ЖКТ, сопряженную с координацией двигательной активности толстого кишечника при воспалительных процессах (вызванных, в частности, липополисахаридом).

Кроме того, эндоканнабиноидная система вовлечена в рефлекторные механизмы модуляции функционирования селезенки как иммунного органа. Об этом свидетельствует тот факт, что инфузия АЕА, как и ЛПС, в ободочную кишку сопровождается рефлекторным усилением эфферентного притока к селезенке. Надо отметить, что предварительное введение АЕА не изменяет вызванной ЛПС интенсификации СЭИ в селезеночном нерве, тогда как инфузия AM 281 за 30 минут до ЛПС отменяла эффекты последнего на СЭИ.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. **Batt, R.M.** Enteral bacteria: friend or foe? / R.M. Batt, H.C. Rutgers, C. Sancak // J. Small Animal Practice. – 1996. – Vol. 37. – P. 261-271.
2. **Чадвик, И.С.** Гастроэнтерология / И.С. Чадвик, С.Ф. Филипс. – М., 1998. – 430 с.
3. Hales, J.R. Limitation of heat tolerance / J.R. Hales, R.W. Hubbard, S.L. Gaffin // In: Handbook of Physiology / Chapter "Environmental Physiology". – Melbourne. – 1993. – 263 p.
4. Cannabinoid CB1-receptor mediated regulation of gastrointestinal motility in mice in a model of intestinal inflammation / A.A. Izzo [et al] // Br. J. Pharmacol. – 2001. – Vol. 134. – P. 563-570.
5. **Kulkarni-Narla, A.** Localization of CB 1-cannabinoid receptor immunoreactivity in the porcine enteric nervous system / A. Kulkarni-Narla, D.R. Brown // Cell Tissue Res. – 2000. – Vol. 302. – P.73-80.
6. **Pertwee, R.** The pharmacology of cannabinoid receptors and their ligands: an overview / R. Pertwee // Int J Obes (Lond). – 2006. – Vol. 30. – P. S13-15.
7. **Freund, T.F.** Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling / T.F. Freund, I. Katona, D. Piomelli // Physiol Rev. – 2003. – Vol. 83. – P. 1017-1066.
8. **Pertwee, R.** Cannabinoids and the gastrointestinal tract / R. Pertwee // Gut – 2001. – Vol. 48. – P. 859-867.
9. **Pertwee, R.** Pharmacology of cannabinoid receptor ligands / R. Pertwee // Curr Med Chem. – 1999. – Vol. 8. – P. 635-64.
10. **Mecholam, R.** Endocannabinoids / R. Mecholam, E. Fride, V. Di Marzo // Eur. J. Pharmacol. – 1998. – Vol. 359. – P. 1-18.
11. Модуляция афферентной и симпатической эфферентной импульсации в нервах кишечника лигандами каннабиноидных рецепторов / А.Ю. Нежута [и др.] // Сигнальные механизмы регуляции физиологических функций. – Минск, 2007. – С. 176-178.
12. A peripheral mechanism for CB1 cannabinoid receptor-dependent modulation of feeding / R. Gomez [et al.] // J. Neurosci. – 2007. – Vol. 22(21). – P. 9612-9617.
13. Inhibition of intestinal motility by anandamide, an endogenous cannabinoid / A. Calingano [et al] // Eur. J. Pharmacol. – 1997. – Vol. 340. – P. R7-R8.
14. **Izzo A.A.** Inhibitory effect of cannabinoid agonists on gastric emptying in the rat / A.A. Izzo // Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. – 1999. – Vol. 360. – P. 221-223.

15. **Рудая, А.Ю.** Особенности изменения тонческой афферентной импульсации висцеральных нервов после введения в тонкую и толстую кишку липополисахарида *E. Coli* / А.Ю. Рудая, В.В. Солтанов // *Новости медико-биологических наук.* – 2004. – № 4. – С. 35-39.
16. **Солтанов, В.В.** Закономерности изменений афферентной и симпатической эфферентной импульсации после введения в ободочную кишку крыс липополисахарида *E. Coli* / В.В. Солтанов, А.Ю. Рудая // *Новости медико-биологических наук.* – 2004. – № 4. – С. 13-17.
17. Activation and selectivity of splenic sympathetic nerve electrical activity response to bacterial endotoxin / B.J. MacNeil // *Am J Physiol.* – 1996. – Vol. 270 (1 Pt 2). – P. R264-R270.
18. **Dittel, B.N.** Direct suppression of autoreactive lymphocytes in the central nervous system via the CB2 receptor / B.N. Dittel // *Br. J. of Physiol.* – 2008. – Vol. 153. – P. 271-276.
19. **Miller, A.M.** CB2 receptor-mediated migration of immune cells: it can go either way / A.M. Miller, N. Stella // *Br. J. of Physiol.* – 2008. – Vol. 153. – P. 299-308.

Поступила в редакцию 30.06.2008 г.