

DOI: 10.30906/0869-2092-2019-82-9-9-14

ВЛИЯНИЕ БЛОКАДЫ NK1-РЕЦЕПТОРОВ НА АБДОМИНАЛЬНУЮ НОЦИЦЕПЦИЮ У БОДРСТВУЮЩИХ СОБАК

О. А. Любашина, И. И. Бусыгина¹

В опытах на бодрствующих собаках впервые продемонстрирован дозозависимый тормозный эффект блокады NK1-рецепторов маропитанта цитратом в отношении абдоминальной ноцицепции. Препарат в дозе 1 мг/кг уменьшал висцеромоторную (сокращение брюшных мышц) реакцию на ноцицептивное растяжение ректальной области толстой кишки в среднем на $(65,9 \pm 5,1) \%$ ($p < 0,0001$), но не оказывал существенного влияния на вызванную такой стимуляцией тахикардию. Увеличение дозы NK1-антагониста до 1,25 мг/кг приводило к значительному и продолжительному (не менее 90 мин) угнетению обеих рефлекторных реакций в среднем на $(77,6 \pm 4,9) \%$ и $(39,1 \pm 8,6) \%$, соответственно ($p < 0,0001$, критерий Фридмана), что свидетельствует о развитии висцеральной анальгезии. Полученные данные указывают на целесообразность дальнейшего изучения антагонистов NK1-рецепторов в качестве потенциальных анальгетических средств для лечения абдоминальных болевых синдромов.

Ключевые слова: ректальное растяжение; абдоминальная ноцицепция; NK1-рецепторы; маропитанта цитрат; собаки.

ВВЕДЕНИЕ

Вещество P общепризнанно считается одним из основных медиаторов боли. К началу XXI века накоплено значительное количество данных, свидетельствующих об участии специфических для этого нейропептида рецепторов нейрокина-1 (NK1) в периферических и центральных процессах проведения болевых сигналов [6, 11, 13]. Последующие исследования на разных видах грызунов, кроликах и кошках продемонстрировали антиноцицептивное действие системно или интратекально введенных антагонистов NK1-рецепторов в условиях болевой механической, термической или продолжительной электрической стимуляции соматических нервов, электростимуляции тройничного ганглия, а также при соматической воспалительной или нейрогенной гипералгезии и периферической нейропатии [3, 7]. В значительно меньшем количестве работ, выполненных на моделях висцеральной боли, было показано тормозное влияние системной или центральной блокады рецепторов NK1 на ноцицептивные рефлекторные реакции крыс, морских свинок и кроликов на механическое раздражение желудка, тонкой или толстой кишки в норме и при кишечной гипералгезии, инициированной воспалением или стрессом [5, 6]. При отсутствии гена NK1-рецепторов у мышей также было выявлено снижение висцеральной болевой чувствительности [3].

В свою очередь, в клинических исследованиях с разными болевыми синдромами, включающими послеоперационную зубную боль, мигрень, фибромиалгию, периферическую нейропатию и постгерпетическую невралгию, антагонисты NK1-рецепторов оказались неэффективными [6, 7, 9]. Было высказано предположение о том, что одной из причин расхождения экспериментальных и клинических данных могут быть различия в распределении и функциях вещества P и активируемых им NK1-рецепторов в нервной системе мелких животных и человека, ассоциированные с уменьшением вклада этого нейропептида в восприятие боли у более высоко организованных видов млекопитающих [3, 7]. Между тем недавно продемонстрированные положительные эффекты блокады NK1-рецепторов при дискомфорте и болевых ощущениях, вызванных растяжением толстого кишечника, у здоровых испытуемых и пациентов с синдромом раздраженной кишки [5, 13, 14] позволяют предположить существование сохранившегося в процессе филогенеза вклада NK1-зависимых механизмов в контроль висцеральной болевой чувствительности. Однако полученные в клинических исследованиях данные не позволяют четко отделить непосредственный эффект NK1-антагониста на передачу болевого сигнала от влияния на процессы его аффективной и когнитивной оценки. Поэтому для окончательного выяснения висцерального анальгетического потенциала блокаторов NK1-рецепторов необходимо их изучение на соответствующих клинически релевантных моделях на крупных, филогенетически более близких к человеку, животных с использованием объективных физиологических методов исследования.

¹ ФГБУН «Институт физиологии имени И. П. Павлова Российской академии наук», Россия, 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 6.

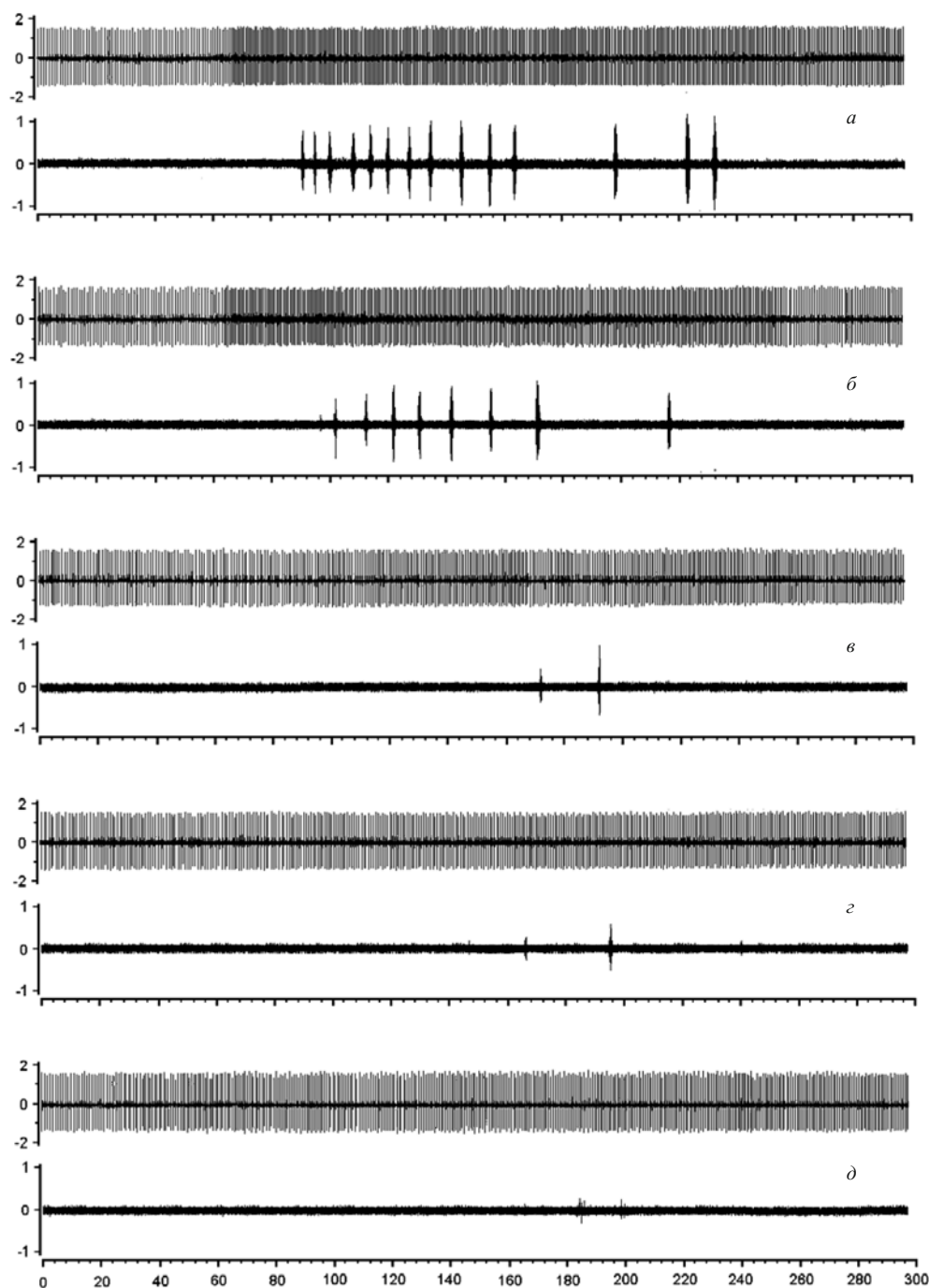


Рис. 1. Изменения в электрокардиограмме (верхняя запись) и в электромиограмме косой мышцы живота (нижняя запись) бодрствующей собаки, вызванные раздуванием баллона в ректальной области толстой кишки давлением 80 мм рт. ст. (черта под записями), до (а) и через 5 (б), 30 (в), 60 (г) и 90 мин (д) после подкожного введения маропитанта цитрата в дозе 1,25 мг/кг. По оси абсцисс — время, с; по оси ординат — напряжение, мВ.

В связи с этим целью данной работы было изучение влияния блокады NK1-рецепторов их специфическим антагонистом маропитанта цитратом на абдоминальную ноцицепцию у бодрствующих собак. Маропитанта цитрат ((2*S*,3*S*)-2-бензгидрил-N-(5-*трет*-бутил-2-метоксибензил)хинуклидин-3-амин цитрат моногидрат, молекулярная масса 678,81 Да) относится к группе

противорвотных средств, блокирует действие субстанции P в нервной системе.

Для инициации болевых ощущений у животных применяли механическое растяжение ректальной области толстой кишки или так называемое ректальное растяжение — физиологически наиболее адекватный метод [2, 12], широко используемый в клинических исследованиях абдоминальной боли [14]. Вызываемый

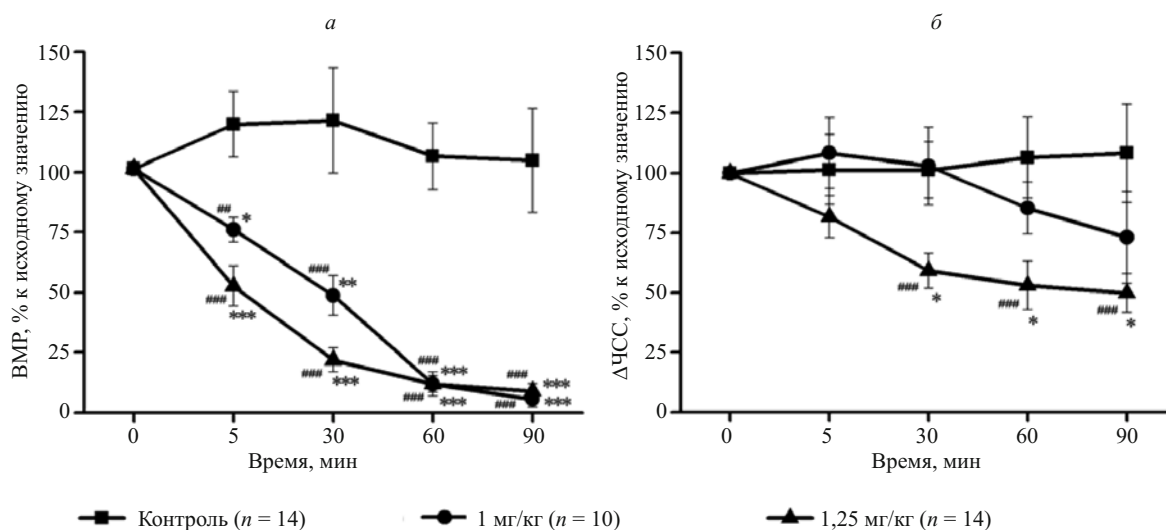


Рис. 2. Влияние маропитанта цитрата в дозах 1 и 1,25 мг/кг (подкожно) на висцеромоторную реакцию (а) и тахикардию (б), вызванные ноцицептивным ректальным растяжением у бодрствующей собаки. По оси абсцисс — время после инъекции препарата. Изменения значимы по сравнению с соответствующими исходными данными ([#] $p < 0,05$, ^{##} $p < 0,01$ и ^{###} $p < 0,001$, парный критерий Вилкоксона) и по сравнению с контролем (^{*} $p < 0,05$, ^{**} $p < 0,01$ и ^{***} $p < 0,001$, критерий U Вилкоксона — Манна — Уитни). $M \pm m$, n — число опытов в каждой группе.

такой стимуляцией ноцицептивный ответ оценивали по объективным, количественно измеряемым физиологическим маркерам — висцеромоторной (сокращения брюшных мышц) и сердечно-сосудистой (изменение частоты сердечных сокращений) рефлексорным реакциям [1, 2, 12].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на 5 взрослых самках беспородных собак с массой тела 16 – 31 кг (виварий Института физиологии имени И. П. Павлова РАН, Санкт-Петербург). Эксперименты проводили в соответствии с требованиями Комиссии по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных при Институте физиологии имени И. П. Павлова РАН. Ректальное растяжение осуществляли тонкостенным резиновым баллоном, который вводили на расстояние 8 – 10 см краниальнее анального сфинктера и раздували воздухом до давления 80 мм рт. ст. [1, 2]. Висцеромоторную и сердечно-сосудистую реакции регистрировали на электромиограмме и электрокардиограмме, соответственно. Миоэлектрическую активность записывали с помощью стальных игольчатых электродов, введенных в правую наружную косую мышцу живота. Для регистрации электрокардиограммы использовали накладные металлические электроды, которые фиксировали на передних (активные отведения) и левой задней (индифферентный электрод) лапах животного. В обоих случаях сигналы от регистрирующих электродов подавали на вход усилителя (DAM 80, World Precision Instruments Inc., США). До начала исследования все собаки проходили двухнедельный период адаптации к экспериментальной обстановке, введению

интаректального баллона и установке регистрирующих электродов.

После соответствующего усиления сигналы электромиограммы и электрокардиограммы поступали на входы 2 каналов компьютерной звуковой карты и с помощью программы Audition 3 (“Adobe Corp.”, США) оцифровывались, визуализировались на экране монитора и сохранялись в памяти компьютера для последующего анализа программой Spike 2 (“CED”, Великобритания). Запись обоих показателей осуществляли в течение 5 мин: 1 мин до ректального растяжения, 3 мин во время и 1 мин после ректального растяжения. Минимальный временной интервал между ноцицептивными раздражениями составлял 25 мин. Величину висцеромоторной реакции определяли интегрированием миоэлектрической активности, зарегистрированной во время ректальной стимуляции в мВ. Изменения в частоте сердечных сокращений оценивали по данным электрокардиограммы как разность между средним количеством R-зубцов в минуту во время ноцицептивного раздражения и их числом в предшествующий период покоя.

Маропитанта цитрат в форме 1 % раствора для инъекций (Церения, “Zoetis Inc.”, США) вводили подкожно в дозах 1 мг/кг ($n = 10$) и 1,25 мг/кг ($n = 14$), что соответствовало 1,6 – 3,1 и 2,0 – 3,9 мл раствора на животное в зависимости от его массы. В контрольных опытах ($n = 14$) осуществляли подкожное введение эквивалентного объема физиологического раствора. Эксперименты на каждом отдельно взятом животном проводили не чаще, чем 1 раз в 3 недели. Выполнявшиеся на одной собаке контрольные опыты и эксперименты с введением определенной дозы маропитанта цитрата чередовались в случайном порядке (их очередность

определялась по таблице случайных чисел). Регистрацию висцеромоторной реакции и изменений частоты сердечных сокращений, вызываемых ноцицептивным ректальным растяжением, осуществляли до и после подкожного введения через 5, 30, 60 и 90 мин. Последующую обработку результатов и построение соответствующих графиков производили с помощью программы Origin 7.5 ("Origin Lab Corp.", США). Статистический анализ полученных данных осуществляли с использованием программы InStat 3.02 ("GraphPad Software Inc.", США) с применением непараметрических методов для парных (тесты Фридмана и Вилкоксона) и непарных (тест Манна — Уитни — Вилкоксона) измерений. Данные представлены как среднее значение \pm ошибка среднего, n — число экспериментов с определенной дозой препарата или контрольных опытов, выполненных в сумме на всех участвовавших в исследовании животных.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

У всех экспериментальных животных ноцицептивное растяжение толстой кишки вызывало выраженную висцеромоторную реакцию, которая проявлялась в виде серии сокращений косой мышцы живота со средней частотой ($5,1 \pm 0,4$) сокр./мин (число измерений $n = 38$). При этом животные также демонстрировали увеличение частоты сердечных сокращений от ($88,3 \pm 1,9$) до ($101,1 \pm 1,6$) сокр./мин ($p < 0,0001$), парный критерий Вилкоксона, $n = 38$. Величина прироста в среднем составляла ($12,9 \pm 1,1$) сокр./мин ($15,2 \pm 1,5$ %). Типичные изменения в электрокардиограмме и электромиограмме, вызываемые ректальной стимуляцией, представлены на рис. 1, а.

Введение физиологического раствора в контрольных экспериментах ($n = 14$, рис. 2) не оказывало статистически значимого влияния на инициируемые растяжением кишки миоэлектрическую активность ($p = 0,81$, $Fr = 1,60$, критерий Фридмана) и тахикардию ($p = 0,97$, $Fr = 0,55$). Аналогичное введение маропитанта цитрата в дозах 1 мг/кг ($n = 10$) и 1,25 мг/кг ($n = 14$) сопровождалось существенным уменьшением висцеромоторной реакции ($p < 0,0001$, $Fr = 37,04$ для первой и $p < 0,0001$, $Fr = 42,07$ для второй дозы). Угнетающее действие препарата проявлялось уже через 5 мин после применения, когда величина реакции снижалась в среднем до ($74,6 \pm 5,1$), ($p = 0,002$, парный тест Вилкоксона), и ($51,2 \pm 8,4$) % от исходного уровня ($p < 0,0001$) для меньшей и большей доз, соответственно (рис. 2, а). В этой временной точке эффекты введения маропитанта цитрата характеризовались как статистически значимые также в сравнении с контролем ($p = 0,013$, $U = 28,0$, тест Манна — Уитни — Вилкоксона для дозы в 1 мг/кг и $p = 0,0008$, $U = 28,0$ для дозы в 1,25 мг/кг). В дальнейшем тормозное действие NK1-антагониста на ноцицептивный висцеромоторный рефлекс усиливалось (рис. 1, б — д). К концу реги-

страции (90 мин) величина реакции после введения препарата в дозе 1 мг/кг снижалась до ($4,1 \pm 1,9$) % от исходного значения ($p < 0,0001$, парный тест Вилкоксона), а в дозе 1,25 мг/кг — до ($7,5 \pm 3,1$) % ($p = 0,0001$), в обоих случаях максимально отличаясь от данных контроля ($p < 0,0001$, $U = 4,0$, тест Манна — Уитни — Вилкоксона). Несмотря на значительную эффективность маропитанта цитрата в обеих исследованных дозах, межгрупповое сравнение показало, что вплоть до 30-й мин эксперимента действие препарата на висцеромоторный рефлекс в дозе 1,25 мг/кг было существенно более выражено, чем таковое в дозе 1 мг/кг ($p = 0,011$, $U = 27,0$, тест Манна — Уитни — Вилкоксона), свидетельствуя о замедленном развитии эффекта в последнем случае.

Действие маропитанта цитрата на вызванную ректальной стимуляцией тахикардию было также угнетающим, но менее выраженным (рис. 2, б). При этом введение NK1-антагониста в дозе 1 мг/кг, несмотря на общую тенденцию к подавлению указанной сердечно-сосудистой реакции, не вызывало в ней существенные по отношению к исходному уровню изменения ($p = 0,08$, $Fr = 8,23$, критерий Фридмана), тогда как тормозное действие препарата на эту же реакцию в дозе 1,25 мг/кг достигало максимального уровня статистической значимости ($p < 0,0001$, $Fr = 24,31$). Уменьшение вызываемой ноцицептивным раздражением тахикардии наблюдали уже через 5 мин после введения большей дозы маропитанта цитрата, однако существенный по сравнению с начальными данными эффект был зафиксирован лишь спустя 30 мин, когда величина реакции снизилась до ($59,1 \pm 7,2$) % ($p = 0,0002$, парный тест Вилкоксона). Действие NK1-антагониста в этой временной точке также было статистически значимым по отношению к контролю ($p = 0,018$, $U = 34,0$, тест Манна — Уитни — Вилкоксона).

Спустя 90 мин после введения препарата в дозе 1,25 мг/кг исследуемый показатель сохранялся на уровне ($49,8 \pm 8,1$) %, что было существенно ниже исходного ($p = 0,0001$, парный тест Вилкоксона) и контрольного значений ($p = 0,026$, $U = 33,0$, тест Манна — Уитни — Вилкоксона). Межгрупповое сравнение выявило значительные различия в эффективности маропитанта цитрата в меньшей и большей дозах в отношении вызванной абдоминальной ноцицепцией тахикардии на 30-й ($p = 0,021$, $U = 15,5$, тест Манна — Уитни — Вилкоксона) и 60-й ($p = 0,03$, $U = 13,0$) минутах эксперимента. При этом ни в одной из изученных доз и ни в одной из временных точек препарат не оказывал существенного влияния на базальный (в период покоя) уровень частоты сердечных сокращений ($p = 0,39 - 0,49$, $Fr = 3,41 - 4,09$, критерий Фридмана).

В проведенном исследовании на крупных бодрствующих животных продемонстрирован дозозависимый тормозный эффект блокады NK1-рецепторов ма-

ропитанта цитратом на абдоминальную ноцицепцию, вызванную механическим растяжением толстой кишки. При подкожном введении в дозе 1 мг/кг, рекомендуемой в качестве терапевтической при лечении тошноты и рвоты у собак [15], препарат угнетал висцеромоторный рефлекторный ответ на кишечную стимуляцию, но не оказывал существенного влияния на вызванную таким раздражением тахикардию. Увеличение дозы NK1-антагониста до 1,25 мг/кг сопровождалось эффективным и продолжительным (не менее 90 мин) уменьшением как висцеромоторной, так и сердечно-сосудистой ноцицептивных реакций.

Висцеромоторный ответ является общепринятым физиологическим маркером абдоминальной ноцицепции у бодрствующего животного, широко используемым при изучении висцерального анальгетического потенциала фармакологических веществ на грызунах [3, 12]. Сердечно-сосудистая прессорная реакция, проявлением которой является тахикардия, также является важным рефлекторным компонентом поведенческого ответа на боль, однако она менее востребована в фармакологических исследованиях на мелких животных из-за технических трудностей в регистрации. Условия проведения наших экспериментов на собаках позволили осуществить параллельную оценку обоих рефлексов с помощью клинически релевантных методов, что для изучения анальгетического действия исследуемого фармакологического препарата наиболее информативно. Действительно, продемонстрированное нами угнетающее влияние маропитанта цитрата в дозе 1 мг/кг на висцеромоторную реакцию согласуется с полученными ранее данными о подавлении этого рефлекса после введения блокаторов NK1-рецепторов у грызунов [3, 5, 6], которое рассматривается как доказательство антиноцицептивного действия исследуемых соединений. Однако неспособность маропитанта цитрата в этой дозе существенно изменять вызванную ректальной стимуляцией тахикардию не позволяет однозначно утверждать, что выявленный эффект является результатом влияния NK1-антагониста на восходящую передачу болевого сигнала, а не связан, например, с модуляцией спинальных механизмов, участвующих в реализации висцеромоторного рефлекса. В свою очередь, угнетение обеих реакций после применения маропитанта цитрата в дозе 1,25 мг/кг можно рассматривать как убедительное свидетельство развития висцерального анальгетического эффекта. Последний может быть обусловлен блокирующим действием препарата на NK1-рецепторы, локализованные на кишечных афферентах и спинальных ноцицептивных нейронах [11, 13], а также влиянием на NK1-зависимые супраспинальные процессы контроля болевой чувствительности, в частности, реализующиеся при участии ростральной вентромедиальной медуллы и голубого пятна [4, 13]. Для выяснения конкретных механизмов действия NK1-антагониста необходимы специальные эксперименты.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют об эффективности блокады NK1-рецепторов маропитанта цитратом при абдоминальной ноцицепции у бодрствующих собак, что указывает на наличие у данного препарата свойств “висцерального” анальгетика. Эти свойства могут отчасти объяснять продемонстрированный ранее потенцирующий эффект этого препарата на действие общих анестетиков при овариогистерэктомии у домашних животных [8, 10]. Представляют интерес дальнейшие исследования этого и других антагонистов NK1-рецепторов как потенциальных средств для лечения абдоминальных болевых синдромов в клинической практике.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У бодрствующих собак блокада NK1-рецепторов их специфическим антагонистом маропитанта цитратом (однократное введение в дозе 1,25 мг/кг) сопровождается продолжительным (не менее 90 мин) угнетением вызванных ноцицептивным растяжением толстой кишки висцеромоторной реакции (в среднем на $77,6 \pm 4,9\%$, $p < 0,0001$) и тахикардии (в среднем на $39,1 \pm 8,6\%$, $p < 0,0001$), что может свидетельствовать о развитии висцеральной анальгезии.

ЛИТЕРАТУРА

1. О. А. Любашина, И. И. Бусыгина, С. С. Пантелеев, А. Д. Ноздрачев, *Докл. Академии наук*, **473**(5), 613 – 617 (2017).
2. С. С. Пантелеев, И. И. Бусыгина, О. А. Любашина, *Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова*, **99**(4), 471 – 483 (2013).
3. S. Boyce, R. G. Hill, *Tachykinins (Handb. Exp. Pharmacol., 164*, P. Holzer (ed.), Springer, Berlin, Heidelberg (2012), pp. 441 – 457.
4. T. S. Brink, C. Pacharinsak, S. G. Khasabov, et al., *J. Neurophysiol.*, **107**(4), 1210 – 1221 (2012).
5. M. Corsetti, F. Akyuz, J. Tack, *Neurogastroenterol. Motil.*, **27**(10), 1354 – 1370 (2015).
6. R. G. Hill, K. R. Oliver, *Handb. Exp. Pharmacol.*, **177**, 181 – 216 (2007).
7. L. M. L. Lai, W. K. K. Wu, M. T. V. Chan, *Postoperative Nausea and Vomiting*, T. J. Gan and A. S. Habib (eds.), Cambridge University Press, Cambridge (2016), pp. 74 – 89.
8. M. Marquez, P. Boscan, H. Weir, et al., *PLoS One*, **10**(10):e0140734, 1 – 10 (2015).
9. M. Muñoz, R. Coveñas, *Amino Acids*, **46**(7), 1727 – 1750 (2014).
10. S. Niyom, P. Boscan, D. C. Twedt, et al., *Vet. Anaesth. Analg.*, **40**(4), 425 – 431 (2013).
11. M. Pissarek, *World J. Neurosci.*, **4**(4), 353 – 383 (2014).
12. E. S. Schwartz, G. F. Gebhart, *Behavioral Neurobiology of Chronic Pain*, B. K. Taylor and D. Finn (eds), Springer, Berlin, Heidelberg (2014), pp. 171 – 197.
13. M. S. Steinhoff, B. von Mentzer, P. Geppetti, et al., *Physiol. Rev.*, **94**(1), 265 – 301 (2014).
14. K. Tillisch, J. Labus, B. Nam, et al., *Aliment. Pharmacol. Ther.*, **35**(3), 360 – 367 (2012).
15. L. A. Trepanier, *Clinical's Brief. Pharmacology, Medications & Therapeutics*, 75 – 77 (2015).

EFFECT OF THE NK1 RECEPTOR BLOCKADE ON ABDOMINAL NOCICEPTION IN AWAKE DOGS

O. A. Lyubashina and I. I. Busygina

Laboratory of Cortico-Visceral Physiology, I.P. Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, Nab. Makarova 6, St. Petersburg, 199034 Russia

The dose-dependent effect of the blockade of NK1 receptors by maropitant citrate on the inhibition of abdominal nociception was demonstrated for the first time in experiments on awake dogs. The subcutaneous drug injection at 1 mg/kg was accompanied by decrease in the visceromotor response (contractions of the abdominal muscles) to the nociceptive extension of rectum on the average by $65.9 \pm 5.1\%$ from the pre-treatment level ($p < 0.0001$), but did not produce a substantial effect on the stimulation-induced tachycardia. An increase in the dose of NK1 antagonist to 1.25 mg/kg led to considerable and prolonged (lasting for no less than 90 min) suppression of both reflex reactions on the average by $77.6 \pm 4.9\%$ and $39.1 \pm 8.6\%$, respectively ($p < 0.0001$) which evidenced the development of visceral analgesia. The obtained data point to the expediency of further studying NK1-receptor antagonists as potential analgesics for the treatment of abdominal pain syndrome.

Keywords: rectal extension; abdominal nociception; NK1 receptors; maropitant citrate; dogs.