

УДК 612.884: 611.16

ВЛИЯНИЕ ЛИГАНДОВ КАННАБИНОИДНЫХ РЕЦЕПТОРОВ НА ЛАТЕНТНЫЙ ПЕРИОД БОЛЕВОГО РЕФЛЕКСА И АФФЕРЕНТНУЮ ИМПУЛЬСАЦИЮ В ПОДКОЖНОМ НЕРВЕ БЕДРА ЗДОРОВЫХ КРЫС

А.Ю. Нежута, Т.Б. Мелик-Касумов, Е.В. Иванова

Институт физиологии НАН Беларуси, Минск

Установлено, что подкожная инъекция агониста каннабиноидных рецепторов анандамида (АЕА) в дозе 20 мкг/кг и 30 мкг/кг снижало частоту афферентной импульсации в подкожном нерве бедра и увеличивало латентный период болевого рефлекса (ЛПБР). Использование в аналогичных экспериментальных условиях большей дозы АЕА (50 мкг/кг), напротив, сокращало ЛПБР и вызывало сенситизацию нервных окончаний в коже стопы. Подкожное введение антагониста каннабиноидных рецепторов AM281 также сопровождалось повышением частоты афферентной импульсации в исследуемом нерве и сокращением ЛПБР.

Ключевые слова: каннабиноиды, афферентная импульсация, подкожный нерв бедра, латентный период болевого рефлекса.

It was found that administration of CB-receptor agonist anandamide (AEA) in the dose of 20 or 30 mg/kg under the rat hindpaw skin decreased the afferent impulsion rate in n.saphenus and prolonged the latency of nociceptive reflex (LNR). Injection of 50 µg/kg evokes the shortening of LNR and skin afferent endings sensitization. Antagonist of CB-receptors does change the LNR and afferent impulsion rate in similar manner with 50 µg/kg of AEA.

Key words: cannabinoids, afferent impulsion, n.saphenus, latency of nociceptive reflex.

Принято считать, что анальгетический эффект экзогенных и эндогенных каннабиноидов опосредован активацией центральных СВ1-рецепторов. Тем не менее, есть свидетельства того, что эндогенный агонист каннабиноидных рецепторов анандамид (АЕА), введенный локально в место вызванного карагенином повреждения ткани, оказывал антиноцицептивное действие и устранял отек даже в дозах, неэффективных при системной инъекции [4]. Аналогичные эффекты отмечены при локальном использовании формалина в качестве повреждающего фактора [4]. Эти факты согласуются с результатами исследований Calingano et al. (1998), свидетельствующими о том, что эндоканнабиноидные агонисты блокируют передачу болевого сигнала непосредственно в локусе повреждения ткани [1].

С учетом изложенного, целью данного исследования явилось изучение изменений перцепции боли в коже стопы при введении лигандов СВ-рецепторов подкожно в локус нанесения болевого раздражителя. Для достижения поставленной цели проведены эксперименты по изучению влияния агониста (АЕА) и антагониста каннабиноидных рецепторов (AM281), введенных под кожу задней конечности крысы, на частоту афферентной импульсации в волокнах подкожного нерва бедра и латентный период болевого рефлекса.

Материалы и методы исследования

Экспериментальный материал получен в острых опытах на белых крысах-самцах массой 250-300 г (n = 41). Животных содержали в виварии Института физиологии НАН Беларуси в соответствии с рекомендациями Европейской конвенции по защи-

те животных. Анестезированных тиопенталом натрия (70 мг/кг) крыс располагали в термокамере, температуру которой постоянно поддерживали на уровне +29°C. Активность афферентных волокон в ветвях *n. saphenus* регистрировали на компьютеризированной электрофизиологической установке с помощью биполярных хлорсеребряных электродов. Электрическая активность из аналоговой формы преобразовывалась в цифровую и регистрировалась в виде файлов на диске компьютера. Оценку частоты импульсной активности нерва подсчитывали в импульсах в секунду, используя в этих целях отрицательную фазу каждого электрического разряда нервных волокон. АЕА в дозе 20, 30 и 50 мкг/кг, растворенный в 0,1 мл раствора этилового спирта (C₂H₅OH, 30%), AM281 (Sigma Aldrich, USA) в дозе 25 мкг/кг, растворенный в 0,1 мл раствора, содержащего этиловый спирт, Tween 80 и изотонический раствор NaCl (0,9%) (1 : 1 : 8), вводили подкожно.

Латентный период болевого рефлекса (ЛПБР) измеряли с помощью метода «горячей пластинки» (hot plate). Для этого животных помещали в специальную камеру из оргстекла, находящуюся на «горячей пластинке», температура которой постепенно достигала 48°C. Показателем защитной реакции являлось облизывание животными задней конечности. Порог болевой чувствительности оценивался на основании регистрации величины латентного периода защитной реакции крыс на тепловой ноцицептивный немеханический стимул, т.е. на минимальную температуру, при которой проявлялись первые болевые реакции. ЛПБР измеряли до инъекции исследуемого препарата, а также через 10 и 30 минут после нее.

Экспериментальные данные обрабатывали с помощью пакета программ, разработанных в Институте физиологии НАН Беларуси, и статистического анализа с применением *t*-критерия Стьюдента. Достоверными считали отличия при $p < 0.05$.

Результаты и обсуждение

Установлено, что подкожное введение АЕА в дозе 20 мкг/кг и 30 мкг/кг приводит после непродолжительного латентного периода (5-7 минут) к постепенному снижению частоты афферентной импульсации в исследуемом нерве здоровых крыс. Изменения приобретают достоверный характер ($P < 0,05$) к 40-45-й и 50-55-й минутам, соответственно. При использовании дозы 20 мкг/кг максимальное снижение частоты следования афферентных разрядов регистрировалось к 45-50-й минуте и составило в среднем $18,7 \pm 5,0\%$, по сравнению с уровнем фона (до введения АЕА), тогда как при применении дозы указанного агента 30 мкг/кг, частота афферентной импульсации была максимально снижена, по отношению к фону, на $19,6 \pm 5,1\%$ (рис. 3) на 50-55-й минуте регистрации (рис. 1).

Подкожная инъекция большей дозы указанного агониста каннабиноидных рецепторов (50 мкг/кг) в аналогичных экспериментальных условиях, напротив, приводила к повышению частоты импульсации в чувствительных волокнах подкожного нерва бедра (рис. 2). Латентный период реакции в среднем не превышал 5 минут. Изменения стано-

вились достоверными уже на 10-15-й минутах, а пиковых значений (увеличение на $49,8 \pm 6,7\%$) частота афферентной импульсации достигала к 20-й минуте, после чего несколько снижалась, но оставалась по-прежнему достоверно выше среднего фонового уровня.

Приведенные выше данные согласуются с результатами экспериментов по измерению латентного периода болевого рефлекса (ЛПБР). Установлено, что подкожное введение АЕА в дозе 20 мкг/кг intactным животным сопровождается повышением в среднем с $66,5 \pm 1,7$ с до $72,4 \pm 1,7$ с (то есть на $8,9 \pm 2,4\%$) через 10 минут после инъекции и до $73,7 \pm 1,6$ с (что на $10,8 \pm 2,4\%$ выше, чем до введения препарата) через полчаса после инъекции, что в совокупности с данными о снижении электрической активности чувствительных проводников *n. saphenus* свидетельствует о местном анальгетическом эффекте указанной дозы исследуемого препарата (рис. 3).

Подкожная инъекция 50 мкг/кг АЕА здоровым крысам, наоборот, приводит к резкому и выраженному снижению ЛПБР. На 10-й минуте после подкожной инъекции исследуемой дозы данного агониста каннабиноидных рецепторов ЛПБР в среднем составил $60,9 \pm 2,6$ с, а через полчаса $35,9 \pm 1,7$ с, что, соответственно, на $16,4 \pm 3,8\%$ и $47,3 \pm 2,5\%$ короче, чем до инъекции ($68,2 \pm 2,0$ с) (рис. 5). Последнее позволяет предположить, что в дозе 50 мкг АЕА оказывает гипералгезический эффект (рис. 4).

Вероятно, снижение ЛПБР и повышение интенсивности афферентной импульсации в *n. saphenus* в ответ на введение 50 мкг/кг АЕА обусловлено

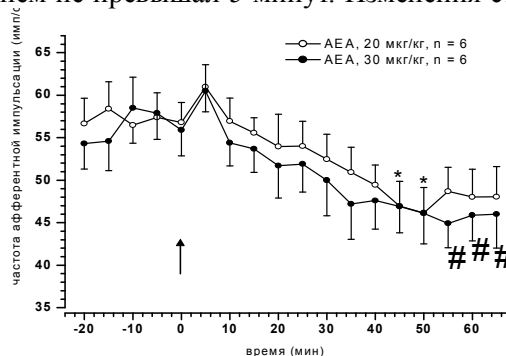


Рисунок 1 – Изменения частоты афферентной импульсации в подкожном нерве бедра после введения АЕА в дозе 20 мкг/кг и 30 мкг/кг. Стрелкой указан момент введения раствора. Знаки * и # - $P < 0,05$

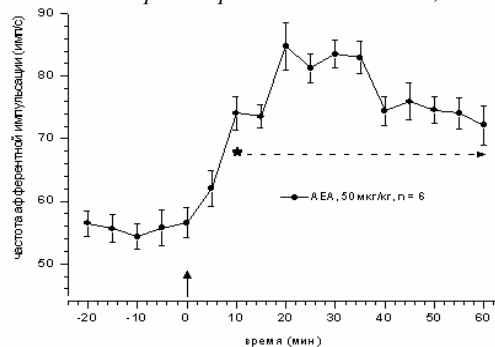


Рисунок 2 – Изменения частоты афферентной импульсации в подкожном нерве бедра после введения АЕА в дозе 50 мкг/кг. Непрерывной стрелкой указан момент введения раствора. Знаком * и пунктирной стрелкой указан интервал времени регистрации, на протяжении которого изменения частоты афферентной импульсации носили достоверный характер ($P < 0,05$)

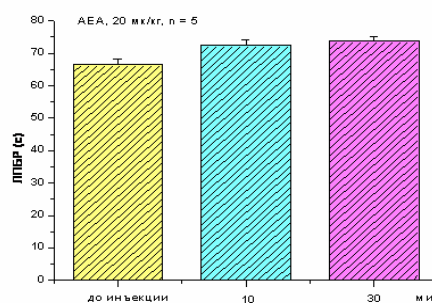


Рисунок 3 – Латентный период болевого рефлекса здоровых крыс до и после подкожного введения агониста каннабиноидных рецепторов АЕА в дозе 20 мкг/кг

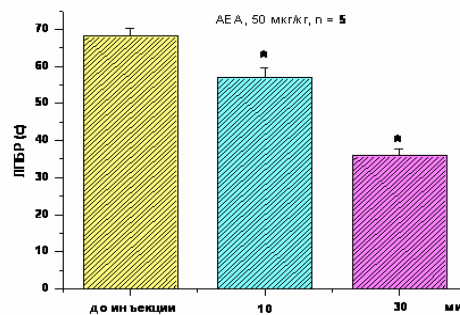


Рисунок 4 – Латентный период болевого рефлекса здоровых крыс до и после подкожного введения агониста каннабиноидных рецепторов АЕА в дозе 50 мкг/кг. Знак * - $P < 0,05$

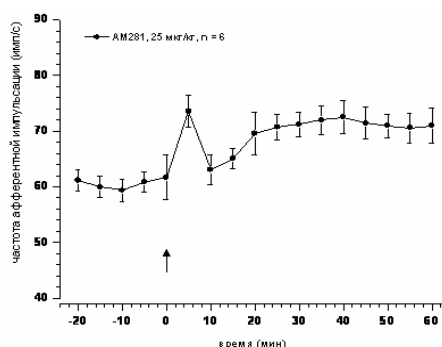


Рисунок 5 – Изменения частоты афферентной импульсации в подкожном нерве бедра после введения АМ281 в дозе 25 мкг/кг.

Стрелкой указан момент введения раствора

тем, что в более высоких концентрациях АЕА, взаимодействуя с ваниллоидными рецепторами, вызывает эффекты, противоположные вызываемым активацией каннабиноидных рецепторов, а именно – мобилизацию кальция и запуск высвобождения *CGRP* [3]. Эти данные согласуются с тем, что АЕА является более патентным агонистом СВ1-рецепторов, по сравнению с ваниллоидными (VR). Следует также упомянуть, что агенты, способствующие транспорту АЕА в клетки, увеличивают способность последнего активировать VR1 рецепторы. Так, установлено, что активация транспорта АЕА через мембрану (АМТ) донорами оксида азота заметно усиливает взаимодействие АЕА с ваниллоидными рецепторами. В то же время, ингибирование АМТ приводит к противоположному эффекту. Таким образом, действуя на одни те же ноцицептивные нервные окончания, в зависимости от состояния АМТ, АЕА может вызывать как усиление (через VR1 рецепторы), так и ослабление (через СВ1-рецепторы) болевой чувствительности [2].

В другой серии экспериментов изучались изменения частоты афферентной импульсации в подкожном нерве бедра и ЛПБР при введении под кожу стопы задней конечности крысы антагониста каннабиноидных рецепторов АМ281 в дозе 25 мкг/кг. После подкожной инъекции АМ281 у здоровых крыс в первые 3-6 минут наблюдается резкое повышение электрической активности центростремительных проводников в *n. saphenus*, после которого частота афферентных импульсов возвращается к фоновому уровню. Через 15-20 минут после инъекции исследуемый показатель начинает снова постепенно расти и достигает максимальных значений (в среднем на 17,5±4,7% выше уровня фона) к 40-45 минуте и остается повышенным до конца (60 минут) времени регистрации (рис. 5).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что АМ281, введенный подкожно, вызывает противоположные по направленности реакции, по сравнению с таковыми в ответ на введение в аналогичных экспериментальных условиях АЕА в дозе 20мкг/кг и 30 мкг/кг.

В серии экспериментов по измерению ЛПБР

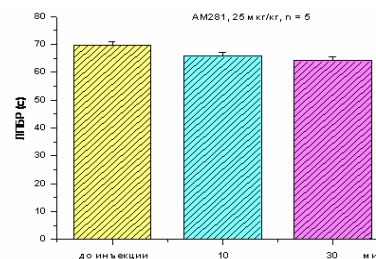


Рисунок 6 – Изменения частоты афферентной импульсации в подкожном нерве бедра после введения АМ281 в дозе 25 мкг/кг. Стрелкой указан момент введения раствора. Знак * - $P < 0,05$

здоровых крыс установлено, что подкожная инъекция 25 мкг/кг АМ281 недостоверно сокращает латентный период реакции на болевой раздражитель. Так, ЛПБР животных до введения АМ281 составил в среднем 69,8±1,3 с, тогда как через 10 минут после введения он сократился до 65,7±1,3 с (на 5,8±1,9 % короче, чем до инъекции). Через 30 минут этот показатель все еще оставался недостоверно более коротким – 64,1±1,6 с, что на 8,1±2,2% меньше, чем до инъекции (рис. 6).

Выводы

АЕА, введенный в дозах 20 и 30 мкг/кг под кожу стопы понижает интенсивность афферентной импульсации в *n. saphenus* и увеличивая ЛПБР.

Применение в аналогичных условиях 50 мкг/кг АЕА вызывает повышение частоты афферентной импульсации в *n. saphenus* и сокращает ЛПБР.

Введение блокатора СВ-рецепторов АМ281 под кожу стопы повышает электрическую активность афферентных проводников подкожного нерва бедра и сокращает ЛПБР.

Заключение

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что АЕА способен модулировать локальную перцепцию боли у здоровых крыс и в зависимости от дозы оказывать анальгетический или гипералгический эффект. Однако поскольку подкожное введение антагониста СВ-рецепторов АМ281 приводит к повышению частоты афферентной импульсации в *n. saphenus* и сокращению ЛПБР, то можно предположить, что обезболивающий эффект АЕА хотя бы частично обусловлен активацией СВ-рецепторов в локусе раздражения.

Литература

1. Calingano A., La Rana G., Markyannis A., Lin S.Y., Beltramo M., Piomelli D. Inhibition of intestinal motility by anandamide, an endogenous cannabinoid // *Eur. J. Pharmacol.* - 1997. - Vol. 340. - R.7-8.
2. De Petrocellis L., Bisogno T., Maccarone M. et al. The activity of anandamide at vanilloid VR1 receptors requires facilitated transport across the cell membrane and is limited by intracellular metabolism // *J. Biol. Chem.* - 2001. - Vol. 276. - P. 12856-12863.
3. Ross R.A., Gibson T. M., Brockie H.C. et al. Structure-activity relationship for the endogenous cannabinoid, anandamide, and certain of its analogues at vanilloid receptors in transfected cells and vas deferens // *Br. J. Pharmacol.* - 2001. - Vol. 132. - P. 631-640.
4. Nackley A.G., Suplita R.L., Hohmann A.G. A peripheral cannabinoid mechanism suppresses spinal fos protein expression and pain behavior in a rat model of inflammation // *Neuroscience.* - 2003b. - Vol. 117. - P. 659-670.

Поступила 08.04.09