

14;15

## Масс-спектрометр для мониторинга реакции на боль у крыс

© А.Ю. Елизаров

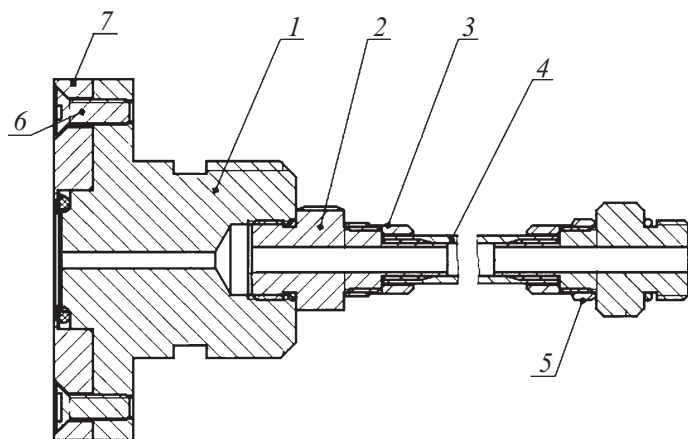
Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН, Санкт-Петербург  
E-mail: a.elizarov@mail.ioffe.ru

Поступило в Редакцию 22 ноября 2016 г.

Выполнены относительные измерения концентрации  $\text{CO}_2$ , выделяемого через кожу у крыс, в ответ на термическое раздражение при помощи масс-спектрометра с мембранным интерфейсом. Проведены наблюдения выделения углекислого газа в ответ на болевой стимул во время интраперитонеальной (внутрибрюшинной) пропофол-лидокаиновой анестезии. Показано, что местный анестетик лидокаин оказывает прямое действие на центральную нервную систему и индуцирует антиноцицептивный эффект в ответ на термическое раздражение.

DOI: 10.21883/PJTF.2017.12.44702.16567

Ответ на болевой стимул у крыс, в том числе и термическое раздражение, оценивается по визуальным критериям: отдергивание лапы, обнюхивание и тому подобное. Если животное находится под общим наркозом, методы анализа антиноцицептивной (защитной) реакции на болевой стимул в режиме реального времени в настоящее время отсутствуют [1]. В работе реакция на термическое раздражение регистрируется при помощи измерения выделения  $\text{CO}_2$  через кожу. Впервые этот метод использовался для анализа стресс-реакции на хирургическую травму во время пропофол-фентаниловой анестезии на операциях трансназальной аденомектомии гипофиза у людей [2].



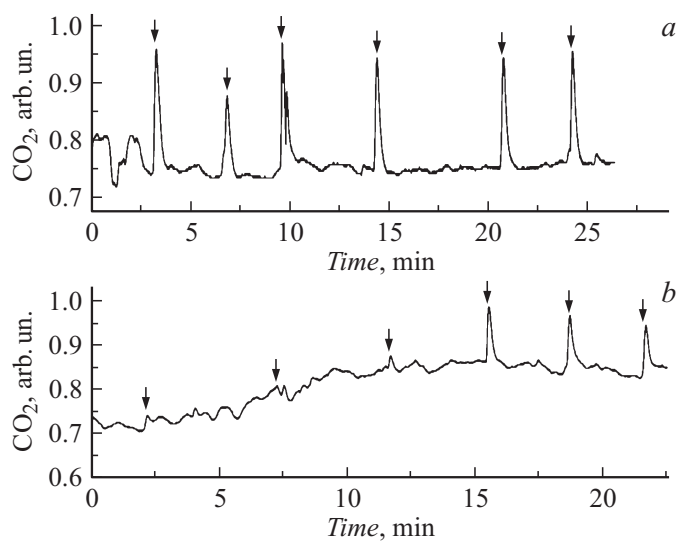
**Рис. 1.** Схема мембранного интерфейса: 1 — корпус интерфейса из нержавеющей стали, 2 — вакуумное уплотнение штуцера с фторопластовой трубкой, 3 — винт для уплотнения вакуумного соединения, 4 — фторопластовая трубка, 5 — вакуумное уплотнение штуцера трубки и камеры масс-спектрометра, 6 — винты вакуумного уплотнения мембраны в корпусе интерфейса, 7 — фланец для фиксации мембраны и пористой пластины при помощи витонového кольца.

В работе используется пропофол-лидокаиновая анестезия. Лидокаин широко используется в клинической практике в качестве местного анестезирующего препарата, который оказывает свое действие путем блокирования натриевых каналов в периферических сенсорах нейронов [3,4]. Лидокаин проходит через гемэнцефалический барьер в клетки головного мозга, и можно предположить, что он оказывает прямое действие на центральную нервную систему [5]. Используя новый метод оценки антиноцицептивного эффекта, были проведены исследования влияния лидокаина на восприятие боли при термическом раздражении хвоста у крыс. Результаты настоящего исследования демонстрируют возможность использования масс-спектрометрического мониторинга выделения  $\text{CO}_2$  для оценки стресс-реакции на болевой стимул.

Метод, использующий масс-спектрометр с мембранным интерфейсом для абсолютных измерений концентрации широкого класса органических соединений, растворенных в воде, обладает пределом обнаружения несколько единиц ppb [5]. Первое описание мембранного интерфейса для масс-спектрометра было представлено в 1961 году, где в качестве мембраны использовался полидиметилсилоксан [6]. При использовании мембранного интерфейса обогащение аналита осуществляется при помощи первапорации (поглощение, диффузия и испарение) через мембрану химических соединений из водного раствора или в случае не растворимого в воде соединения — из водной эмульсии [5]. В 1963 году этот метод впервые использовался для определения относительной концентрации  $O_2$  и  $CO_2$  в воде [7]. Для измерения относительной концентрации  $CO_2$ , выделяемого через кожу, использовался масс-спектрометр с мембранным интерфейсом, в котором использовалась мембрана толщиной  $75 \mu m$ . Интерфейс представляет собой вакуумную камеру, на стенке которой размещен фланец с мембраной (рис. 1). Мембрана фиксировалась при помощи вакуумного уплотнения (витоновое кольцо). Для предотвращения провисания мембраны использовалась пористая медная пластина с диаметром пор  $200 \mu m$ . Интерфейс соединялся с камерой масс-спектрометра при помощи тефлоновой трубки с внутренним диаметром  $4 mm$  [1]. С мембранным интерфейсом использовался квадрупольный масс-спектрометр „Микропор“ („Научные приборы“). Диапазон регистрируемых масс  $300 amu$ . Интерфейс устанавливался на спине крысы, с которой предварительно была убрана шерсть.

Исследования проводились на 10 взрослых ( $280–320 g$ ) самцах белых беспородных крыс. Животных содержали в свободном доступе к стандартной еде и воде. Все эти эксперименты были проведены в соответствии с руководящими принципами исследования экспериментальной боли у животных [7]. В работе антиноцицептивный эффект оценивается по выделению  $CO_2$  через кожу во время термического раздражения — кратковременного погружения хвоста в емкость с горячей водой. Температура воды составляла  $60^\circ C$ . Статистическая обработка результатов выполнялась при помощи программ Excel.

На рис. 2, *a* представлена временная зависимость выделения  $CO_2$  через кожу после интраперитонеального введения пропофола (Fresenius-Kabi) в дозе на килограмм веса крысы —  $40 mg/kg$ . После наступления очевидного отсутствия реакции на внешние раздражители проводился



**Рис. 2.** Временная зависимость концентрации углекислого газа, выделенного через кожу во время анестезии пропофолом (*a*) и во время пропофол-лидокаиновой анестезии (*b*). Стрелками указан болевой импульс.

тест на кратковременное погружение хвоста в емкость с горячей водой. Были зарегистрированы импульсные, стабильные по длительности (несколько секунд) и амплитуде, увеличения концентрации выделяемого через кожу  $\text{CO}_2$  в ответ на каждое термическое раздражение. Разброс амплитуды выбросов углекислого газа составлял не более 10%. Следовательно, в данном случае внутривенная инъекция пропофола обеспечивала только гипнотический эффект (без обезболивания). Результат был подтвержден на 4 крысах.

В качестве обезболивающего препарата на следующем этапе испытаний антиноцицептивной реакции на импульсный болевой стимул использовался лидокаин (ФГУП, Армавирская биофабрика). Лидокаин проходит через гемоянцезалический барьер в клетки головного мозга [8]. Кроме этого в работах [9,10] было обнаружено влияние лидокаина на центральную нервную систему и его модулирующее влияние на восприятие боли. На рис. 2, *b* представлена зависимость выделения

через кожу  $\text{CO}_2$  после интраперитонеального введения пропофола и лидокаина в дозе 40 и 2 mg/kg соответственно. На начальном этапе анестезии зафиксирован антиноцицептивный эффект действия лидокаина на болевой стимул. Это следует из отсутствия импульсного выделения  $\text{CO}_2$  через кожу. На 17-й минуте испытания анальгезия под действием лидокаина заканчивалась и появлялись импульсные выделения  $\text{CO}_2$  через кожу, по амплитуде такие же, как и на рис. 2, а, в отсутствие анальгезии (пропофол обеспечивал только сон крысы). Таким образом, было зарегистрировано влияние лидокаина на натриевые каналы в нейронах центральной нервной системы в режиме реального времени. Следовательно, лидокаин-индуцированная блокада натриевых каналов распространяется в нейроны различных областей мозга (лидокаин легко проникает через гематоэнцефалический барьер) и приводит к подавлению их возбудимости на периферические термические раздражители.

Использование мембранного интерфейса позволяет проводить измерения интенсивности выделения  $\text{CO}_2$  через кожу и имеет перспективы использования для оценки реакции крыс на боль в режиме реального времени. Был зафиксирован антиноцицептивный эффект лидокаина при интраперитонеальной анестезии в дозе 2 mg/ml у крыс. Результаты настоящего исследования демонстрируют возможность лечения боли путем блокирования натриевых каналов лидокаином в нейронах головного мозга.

Автор благодарит сотрудников Института физиологии им. Павлова за содействие в проведении исследований.

Работа выполнена при поддержке РФФИ, проект № 16-08-00537.

## Список литературы

- [1] Rykaczewska-Czerwińska M. // *Pharmacol. Rep.* 2006. V. 58. P. 961–965.
- [2] Елизаров А.Ю., Ершов Т.Д., Левшанков А.И., Черемилло В.Ю. // *ЖТФ.* 2016. V. 86 (11). P. 146–149.
- [3] Sindrup S.H. // *Pain Dig.* 1993. V. 3. P. 7–14.
- [4] Sorensen J., Bengtsson A., Backman E. et al. // *J. Rheumatol.* 1995. V. 24 (6). P. 360–365.
- [5] Short R.T., Fries D.P., Toler S.K. et al. // *Meas. Sci. Technol.* 1999. V. 10. P. 1195–1201.
- [6] Michaels A.S., Bixler H.J. // *J. Polymer. Sci.* 1961. V. 60. P. 413–39.

- [7] *Hoch G., Kok B.* // Arch. Biochem. Biophys. 1963. V. 101. P. 160–170.
- [8] *Zimmermann M.* // Pine. 1983. V. 16. P. 109–110.
- [9] *Pardridge W.M., Sakiyama R., Fierer G.J.* // Clin. Invest. 1983. V. 71. P. 900–908.
- [10] *Cahana A., Carota A., Montadon M.L., Annoni J.M.* // Anesth. Analg. 2004. V. 98. P. 1581–1584.