

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД АНАЛИЗА АНТИНОЦИЦЕПТИВНОГО ЭФФЕКТА ЛИДОКАИНА

© 2017 г. **А.Ю. Елизаров**

Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН, 194021, Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 26

E-mail: a.elizarov@mail.ioffe.ru

Поступила в редакцию 27.10.16 г.

При помощи масс-спектрометра с мембранным интерфейсом выполнены относительные измерения концентрации CO_2 , выделяемого через кожу у крыс в ответ на термическое раздражение. Продемонстрирована возможность использования масс-спектрометра с мембранным интерфейсом для мониторинга антиноцицептивной реакции на болевой стимул во время интраперитонеальной пропофол-лидокаиновой и пропофол-кетаминевой анестезии. Показано, что лидокаин оказывает прямое действие на центральную нервную систему и индуцирует антиноцицептивный эффект в ответ на термическое раздражение.

Ключевые слова: антиноцицептивная система, масс-спектрометр, мембрана, лидокаин, кетамин, пропофол.

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 реакции на болевой стимул в режиме реального времени в настоящее время отсутствуют. В работе реакция на термическое раздражение регистрируется при помощи измерения выделения CO_2 через кожу. Впервые этот метод был использован для анализа стресс-реакции на хирургическую травму во время пропофол-фентаниловой анестезии на операциях аденоктомии гипофиза у людей [1].

В настоящем исследовании используется пропофол-лидокаиновая и пропофол-кетаминевая анестезия. Лидокаин, широко используемый в клинической практике в качестве местного анестезирующего препарата, оказывает свое действие путем блокирования натриевых каналов в периферических сенсорах нейронов [2,3]. Известно также, что лидокаин проходит через гемэнцефалический барьер в клетки головного мозга [4]. В работе [5] было обнаружено влияние лидокаина на центральную нервную систему и его модулирующее влияние на восприятие боли. В данном исследовании с использованием нового метода для оценки антиноцицептивного эффекта были проведены исследования влияния лидокаина на восприятие боли при термическом раздражении. Выполнено сравнение анальгезирующих свойств лидокаина и кетамина. Результаты настоящего исследования демонстрируют

возможность лечения боли путем блокирования натриевых каналов лидокаином в нейронах головного мозга.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Метод, использующий масс-спектрометр с мембранным интерфейсом для измерений концентрации широкого класса растворенных в воде органических соединений, обладает пределом обнаружения несколько единиц ppb [6]. Первое описание мембранного интерфейса для масс-спектрометра было представлено в 1961 г., в качестве материала мембраны был использован полидиметилсилоксан (силикон) [7]. При использовании мембранного интерфейса обогащение аналита осуществляется при помощи пер-вапорации (поглощение, диффузия и испарение) через мембрану химических соединений из водного раствора или, в случае нерастворимого в воде соединения, из водной эмульсии [6]. К недостаткам мембранного интерфейса следует отнести зависимость скорости пер-вапорации через мембрану от полярности молекул, температуры и невозможности анализировать молекулы с отношением m/z более 300. В 1963 г. этот метод впервые был использован для определения относительной концентрации O_2 и CO_2 в воде [8]. В настоящей работе для исследования концентрации органических молекул в биологических жидкостях использовали масс-спектрометр с мембранным интерфейсом, в котором применялась мембрана толщиной 75 μm . Для фиксации мембраны на отверстии

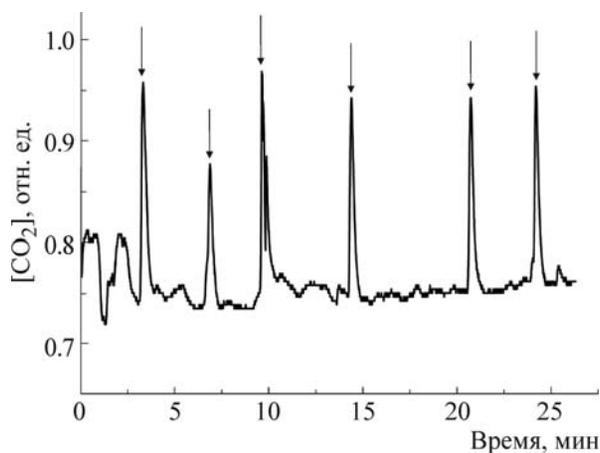


Рис. 1. Временная зависимость концентрации углекислого газа, выделенного через кожу во время анестезии пропофолом. Стрелками указан болевой импульс.

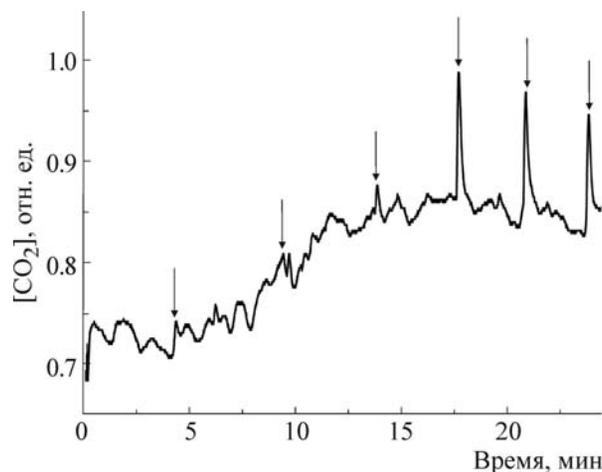


Рис. 2. Временная зависимость концентрации углекислого газа, выделенного через кожу во время пропофол-лидокаиновой анестезии. Стрелками указан болевой импульс.

во фланце интерфейса диаметром 6 мм, расположенном перед ионным источником масс-спектрометра, задействовали пористую титановую пластину с диаметром пор 200 мкм. С мембранным интерфейсом использовали квадрупольный масс-спектрометр PrismaPlus (Pfeiffer Vacuum, Германия). Камеру масс-спектрометра откачивали турбомолекулярным насосом производительностью 80 л/с. Вакуум в камере поддерживался на уровне $2 \cdot 10^{-5}$ мбар. Конструкция интерфейса позволяла осуществлять его нагрев до температуры 45°C [1].

Исследования проводили на 20 взрослых (280–320 г) самцах беспородных белых крыс. Животных содержали в свободном доступе к стандартной еде и воде. Все эксперименты были проведены в соответствии с руководящими принципами исследования экспериментальной боли у животных [9].

В работе антиноцицептивный эффект оценивали по выделению CO_2 через кожу во время термического раздражения – кратковременного погружения хвоста животного в емкость с горячей водой. Температура воды составляла 60°C . Мембранный интерфейс для масс-спектрометрического определения относительной концентрации CO_2 фиксировали на спине крысы (перед установкой интерфейса шерсть на спине крысы удаляли).

РЕЗУЛЬТАТЫ

На рис. 1 представлена временная зависимость выделения CO_2 через кожу после интраперитонеального введения пропофола (Fresenius-Kabi, Германия) в дозе 40 мг/кг массы крысы.

После наступления очевидного отсутствия реакции на внешние раздражители проводили тест на кратковременное погружение хвоста в емкость с горячей водой. В этом случае были зарегистрированы импульсные, стабильные по длительности (несколько секунд) и амплитуде увеличения концентрации выделяемого через кожу CO_2 в ответ на каждое термическое раздражение. Следовательно, в данном случае внутрибрюшная инъекция пропофола обеспечивала только гипнотический эффект (без обезболивания). Эффект зарегистрирован в восьми наблюдениях.

На следующем этапе испытаний в качестве обезболивающего препарата использовали лидокаин (Армавирская биофабрика, Армавир, Россия). На рис. 2 представлена зависимость выделения через кожу CO_2 после интраперитонеального введения пропофола и лидокаина в дозе 40 и 2 мг/кг соответственно. На примере пяти исследований был подобран режим, когда на начальном этапе анестезии зафиксирован антиноцицептивный эффект действия лидокаина на болевой стимул. Это следует из отсутствия импульсного выделения CO_2 через кожу в ответ на болевой стимул. На 17-й минуте испытания анальгезия под действием лидокаина заканчивалась и появлялись импульсные выделения CO_2 через кожу в ответ на болевой стимул, по амплитуде такие же, как и в отсутствие анальгезии (см. рис. 1). 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.

На рис. 3 представлена временная зависимость выделения CO_2 через кожу при пропофол-кетаминовой анестезии в дозе 40 и 0,5 мг/кг соответственно. Интенсивность импульсов CO_2 была стабильна и составляла приблизительно половину от амплитуды импульса CO_2 в случае отсутствия анальгезии, т.е. обезболивание не было полным и анальгетический эффект проявлялся менее явно, чем в случае пропофол-лидокаиновой анестезии.

ВЫВОДЫ

Использование мембранного интерфейса позволяет проводить измерения интенсивности выделения 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 мг/мл у крыс. Таким образом, внутримозговое введение блокаторов натриевых каналов может быть полезным методом в изучении восприятия боли.

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

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 16-08-00537).

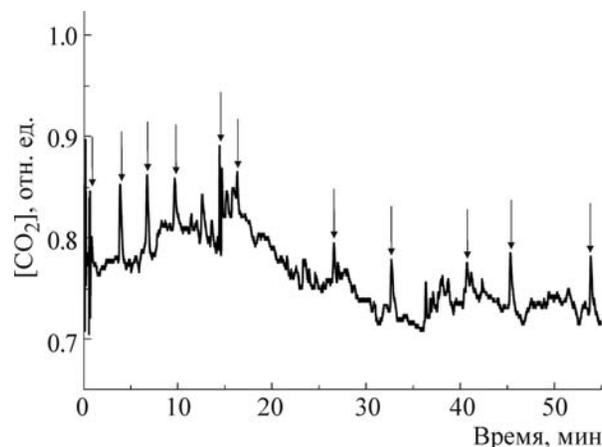


Рис. 3. Временная зависимость концентрации углекислого газа, выделенного через кожу во время пропофол-кетаминовой анестезии. Стрелками указан болевой импульс.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. А. Ю. Елизаров, Биофизика **62** (4), 802 (2017).
2. S. H. Sindrup, Pain Dig. **3**, 7 (1993).
3. J. Sorensen, A. Bengtsson, E. Backman, et al., Scand. J. Rheumatol. **24** (6), 360 (1995).
4. W. M. Partridge, R. Sakiyama, and G. Fierer, J. Clin. Invest. **71**, 900 (1983).
5. A. Cahana, A. Carota, M. L. Montadon, and J. M. Annoni, Anesth. Analg. **98**, 1581 (2004).
6. R. T. Short, D. P. Fries, S. K. Toler, et al., Meas. Sci. Technol. **10**, 1195 (1999).
7. A. S. Michaels and H. J. Bixler, J. Polymer. Sci. **60**, 413 (1961).
8. G. Hoch and B. Kok, Arch. Biochem. Biophys. **101**, 160 (1963).
9. M. Zimmermann, Pain **16** (2), 109 (1983).

Analysis of the Antinociceptive Effect of Lidocaine Using Mass Spectrometry

A.Yu. Elizarov

*Ioffe Physical-Technical Institute, Russian Academy of Sciences,
ul. Politekhnicheskaya 26, St. Petersburg, 194021 Russia*

The mass spectrometer with a membrane interface was used to make relative measurements of concentrations of CO_2 released from rat skin in response to thermal provocation. It was demonstrated that the mass spectrometer with a membrane interface can be used to monitor the antinociceptive response to the pain stimulus under intraperitoneal propofol-lidocaine and propofol-ketamine anesthesia. It was demonstrated that lidocaine produces direct action on the central nervous system and induces antinociceptive effect in response to thermal provocation.

Keywords: antinociceptive system, mass spectrometer, membrane, lidocaine, ketamine, propofol