

УДК 615.212.7

ВЛИЯНИЕ АДЪЮВАНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ВЫРАЖЕННОСТЬ АНАЛЬГЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ МОРФИНА ПРИ СОМАТОГЕННОЙ БОЛИ

Ю.В. Семенова, Н.В. Елисеева, А.А. Спасов

ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

При купировании умеренной и сильной боли рекомендуется комбинировать традиционные опиоиды с коанальгетиками с целью снижения дозы анальгетиков и уменьшения выраженности их побочных эффектов. В исследовании были оценены эффекты совместного применения ряда адъювантных препаратов: галоперидола (0,45 мг/кг), метоклопрамида (5 мг/кг), габапентина (90 мг/кг), диазепама (1 мг/кг), мидазолама (0,3 мг/кг), клонидина (1 мг/кг), атропина (2,7 мг/кг) с субанальгетической дозой морфина (1 мг/кг) в тесте соматогенной боли (отдергивания хвоста от теплового изучения). Было показано, что выраженность антиноцицептивного эффекта морфина значительно увеличивалась при комбинации с галоперидолом, клонидином, габапентином и метоклопрамидом; не изменялась при совместном введении с мидазоламом и атропином; снижалась при сочетании с диазепамом.

Ключевые слова: анальгетическая активность, соматогенная боль, tail flick, морфин, мидазолам, диазепам, метоклопромид, атропин, галоперидол, клонидин, габапентин.

DOI 10.19163/1994-9480-2020-4(76)-141-145

EFFECT OF ADJUVANT PREPARATIONS ON THE EXPRESSION OF ANALGETIC ACTIVITY OF MORPHIN IN SOMATOGENIC PAIN

Yu.V. Semenova, N.V. Eliseeva, A.A. Spasov

FSBEI HE «Volgograd State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation

Combination of traditional opioid with coanalgesics is recommended to reduce the dose of analgesics and the side effects as well as the relief of different pain severity. In this study was evaluated the effectiveness of different adjuvant drugs: haloperidol (0,45 mg/kg), metoclopramide (5 mg/kg), gabapentin (90 mg/kg), diazepam (1 mg/kg), midazolam (0,3 mg/kg), clonidine (1 mg/kg), atropine (2,7 mg/kg) with subanalgesic dose of morphine (1 mg/kg) in the somatogenic pain test (somatogenic pain was modelled with tail-flick). It was shown that the severity of the antinociceptive effect of morphine was significantly increased when combined with haloperidol, clonidine, gabapentin and metoclopramide; did not change when co-administered with midazolam and atropine; decreased when combined with diazepam.

Key words: analgesic activity, somatogenic pain, tail flick, morphine, midazolam, diazepam, metoclopramide, atropine, haloperidol, clonidine, gabapentin.

В настоящее время в клинической практике опиоиды используются в качестве основных анальгетиков для лечения умеренной и сильной боли.

Применение адъювантных анальгетиков (препараты, которые не предназначены для купирования боли, но могут использоваться для этой цели) наиболее эффективно при лечении невропатической боли, фибромиалгии, в комплексном лечении боли при онкологическом процессе.

В качестве адъювантных препаратов чаще всего используются анксиолитики, антиконвульсанты, спазмолитики, агонисты альфа-адренорецепторов.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучить анальгетическую активность адъювантных препаратов при совместном введении с морфином на модели соматогенной боли у мышей-самцов при внутрибрюшинном введении.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены на 105 белых беспородных мышках-самцах массой 20–25 г, содержащихся в условиях вивария (температура 22–24 °С, относительная влажность воздуха 40–50 %) с естественным световым режимом на стандартной диете (ГОСТ Р 50258-92) при соблюдении правил лабораторной практики проведения доклинических исследований в РФ (ГОСТ З 51000.3-96 и 1000.4-96), а также правил и Международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1997). Эксперименты были одобрены региональным исследовательским этическим комитетом Волгоградской области (протокол № 2077-2018 от 30 октября 2018 г.)

Лицензия на деятельность по обороту наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров (№ ФС-34-03-000004-16 от 25 октября 2016 г.).

Изучение анальгетической активности препаратов проводилось на модели отдергивания

хвоста от теплового изучения (tail flick) в соответствии с методикой, описанной в руководстве (Т.А. Воронина, Л.С. Гузевых, 2012) [1].

Животные помещались в фиксатор, затем на дистальную часть хвоста наносилось локальное термическое раздражение источником инфракрасного света ($T = 55\text{ }^{\circ}\text{C}$) с автоматической регистрацией реакции отдергивания хвоста (Ugo Basile, Италия) (латентный период избавления от болевого раздражителя – ЛП, с). Во избежание повреждения тканей максимальное время температурного воздействия ограничивалось 15 с. Изучаемые препараты растворялись в дистиллированной воде и вводились внутривенно в объеме 100 мкл на 10 г веса животного. Регистрация ЛП проводилась трехкратно на 30, 60 и 90 минут после введения адъювантного препарата. При совместном введении морфин вводился за 15 минут до адъювантного препарата. Животные случайным образом были распределены на следующие группы: группа контроля (дистиллированная вода); морфин (1 мг/кг) (Московский эндокринный завод, Россия); морфин (1 мг/кг) + галоперидол (0,45 мг/кг) (ООО «Озон», Россия); морфин (1 мг/кг) + мидазолам (0,3 мг/кг) (Cepexi SAS, Швейцария); морфин (1 мг/кг) + диазепам (1 мг/кг) (Московский эндокринный завод, Россия); морфин (1 мг/кг) + метоклопрамид (5 мг/кг) (Новосибхимфарм АО, Россия); морфин (1 мг/кг) + атропина сульфат (2,7 мг/кг) (Дальхимфарм, Россия); морфин (1 мг/кг) + клонидин (1 мг/кг) (Органика АО, Россия); морфин (1 мг/кг) + габапентин (90 мг/кг) (ПИК-ФАРМА, Россия) по 5 особей в группе. Дозы препаратов выбраны в соответствии с литературными данными и ранее проведенными исследованиями [2].

Статистическая обработка проводилась в программе GraphPad Prism7.0 (среднее значение латентного периода и стандартная ошибка среднего) непарный t-тест и one-way ANOVA с поправкой Даннета. Для оценки влияния адъювантных препаратов рассчитывались показатели активности относительно значений группы контроля (%) и максимально возможного эффекта (МВЭ, %):

$$\text{МВЭ} = \frac{\text{ЛП}_{\text{оп}} - \text{ЛП}_{\text{контр}}}{\text{МАХ}_{\text{время}} - \text{ЛП}_{\text{контр}}} * 100\% ,$$

где $\text{ЛП}_{\text{оп}}$ – латентный период реакции после введения вещества, $\text{ЛП}_{\text{контр}}$ – латентный период реакции до введения вещества, $\text{МАХ}_{\text{время}}$ – максимальное время нанесения раздражителя (15 с).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе исследования влияния адъювантных препаратов на анальгетическую активность морфина была показана неоднородность их эффектов (табл. 1–7).

Средние значения латентного периода отдергивания хвоста в контрольной группе животных составили ($3,59 \pm 0,50$) с ($\text{ЛП}_{\text{контр}}$), что согласуется с данными литературы и результатами предыдущих исследований [3].

Средние показатели активности в группе морфина для 30, 60 и 90 мин – 60,6, 76,9 и 66,2 %, при этом величина МВЭ – 19,1; 24,7 и 21,6 % соответственно.

На первом этапе исследования изучалось взаимодействие морфина с антагонистами D_2 рецепторов – галоперидолом и метоклопрамидом (табл. 1, 2).

Таблица 1

Влияние морфина при совместном введении с галоперидолом на анальгетическую активность в тесте отдергивания хвоста у мышей-самцов при внутривенном введении, с

Время экспозиции, мин	Контроль	Морфин 1 мг/кг	Морфин 1 мг/кг + галоперидол 0,45 мг/кг
30	$3,95 \pm 0,49$	$5,48 \pm 0,35^*$	$8,86 \pm 0,60^{* \#}$
60	$4,07 \pm 0,55$	$7,08 \pm 0,65^*$	$8,63 \pm 0,46^{* \#}$
90	$4,10 \pm 0,53$	$6,54 \pm 0,42^*$	$10,48 \pm 0,69^{* \#}$

Здесь и далее:

*достоверные отличия от группы контроля ANOVA, пост-тест Даннета, $p \leq 0,05$;

#достоверные отличия от группы препарата сравнения – морфина. Непарный t-тест, $p \leq 0,05$.

При комбинировании традиционного опиоида с галоперидолом показатель ЛП достоверно увеличивался во всех временных точках относительно как группы контроля, так и группы морфина. Величина МВЭ в группе совместного введения составила 46,2; 44,2 и 60,4 %, что в среднем в 2,3 больше, чем показатель МВЭ для группы морфина (см. табл. 1).

Совместное введение морфина и метоклопрамида статистически значимо изменяло показатели ЛП относительно данных группы контроля на протяжении всего эксперимента и относительно группы препарата сравнения на 60-й и 90-й минутах (табл. 2).

При этом показатели активности при одновременном введении составили 82,7; 101,8 и 93,9 соответственно, что в среднем на 25 % превышает усредненные показатели активности морфина в каждой из временных точек.

Таблица 2

Влияние морфина при совместном введении с метоклопрамидом на анальгетическую активность в тесте отдергивания хвоста у мышей-самцов при внутрибрюшинном введении, с

Время экспозиции, мин	Контроль	Морфин 5 мг/кг	Морфин 1 мг/кг + метоклопрамид 5мг/кг
30	3,13 ± 0,69	6,75 ± 0,55*	6,56 ± 0,65*
60	3,27 ± 0,36	6,32 ± 0,50*	7,23 ± 0,82**
90	3,45 ± 0,46	5,67 ± 0,45*	6,93 ± 0,63**

На втором этапе изучалось влияние противоэпилептического средства на выраженность морфиновой анальгезии (табл. 3).

Таблица 3

Влияние морфина при совместном введении с габапентином на анальгетическую активность в тесте отдергивания хвоста у мышей-самцов при внутрибрюшинном введении, с

Время экспозиции, мин	Контроль	Морфин 1 мг/кг	Морфин 1 мг/кг + габапентин 90 мг/кг
30	4,06 ± 0,62	5,48 ± 0,77*	7,05 ± 0,57**
60	3,95 ± 0,49	6,04 ± 0,42*	7,92 ± 0,76**
90	4,10 ± 0,56	7,08 ± 0,65*	7,07 ± 0,81*

Одновременное применение морфина и габапентина статистически значимо увеличило показатели латентного периода отдергивания хвоста по сравнению с данными группы контроля и группой опиоида (за исключением временной точки 90 мин). Величина МВЭ при этом в 1,5 раза превышала показатели группы морфина (30,3; 38,0 и 30,5% соответственно).

Третьим этапом являлось изучение влияния производных бензодиазепина на выраженность анальгетического эффекта морфина (табл. 4, 5)

Таблица 4

Влияние морфина при совместном введении с диазепамом на анальгетическую активность в тесте отдергивания хвоста у мышей-самцов при внутрибрюшинном введении, с

Время экспозиции, мин	Контроль	Морфин 4 мг/кг	Морфин 4 мг/кг + диазепам 1 мг/кг
30	3,13 ± 0,69	5,29 ± 0,33*	4,17 ± 0,38**
60	3,27 ± 0,36	6,46 ± 0,34*	3,88 ± 0,61#
90	3,10 ± 0,20	5,20 ± 0,38*	3,78 ± 0,37#

При совместном введении диазепам и морфина отличия ЛП от контрольной группы были выявлены только через 30 минут после введения (табл. 4). При этом во всех временных точках наблюдалось статистически значимое отличие от группы морфина, а показатели МВЭ прогрессивно снижались в несколько раз (3,8; 9,7 и 12,9 раз соответственно).

Таблица 5

Влияние морфина при совместном введении с мидазоламом на анальгетическую активность в тесте отдергивания хвоста у мышей-самцов при внутрибрюшинном введении, с

Время экспозиции, мин	Контроль	Морфин 1 мг/кг	Морфин 1 мг/кг + мидазолам 0,3 мг/кг
30	3,61 ± 0,21	5,80 ± 0,55*	5,46 ± 0,99*
60	3,64 ± 0,27	6,10 ± 0,80*	6,35 ± 0,75*
90	3,58 ± 0,34	5,65 ± 0,83*	6,23 ± 0,55*

Комбинирование морфина и мидазолама привело к значительному увеличению показателей латентного периода отдергивания хвоста относительно данных группы контроля, при этом различий в ЛП с группой морфина выявлено не было (табл. 5).

На четвертом этапе исследовалось взаимодействие морфина с агонистом α-адренорецепторов (табл. 6).

Таблица 6

Влияние морфина при совместном введении с клонидином на анальгетическую активность в тесте tail flick у мышей-самцов при внутрибрюшинном введении, с

Время экспозиции, мин	Контроль	Морфин 1 мг/кг	Морфин 1 мг/кг + клонидин 1 мг/кг
30	3,95 ± 0,35	5,48 ± 0,77	10,98 ± 1,55**
60	3,84 ± 0,32	6,04 ± 0,42*	9,50 ± 1,23**
90	3,97 ± 0,42	7,08 ± 0,65*	11,14 ± 1,56**

Сочетание морфина и клонидина способствовало статистически достоверному увеличению показателей ЛП во всех временных точках относительно групп контроля и морфина. Активность этой группы в среднем на 125 % превосходила показатели группы морфина (205,85; 164,62; 210,31 % соответственно).

На заключительном этапе оценивалось взаимодействие морфина и М-холиноблокатора (табл. 7).

Таблица 7

Влияние морфина при совместном введении с атропином на анальгетическую активность в тесте отдергивания хвоста у мышей-самцов при внутривенном введении, с

Время экспозиции, мин	Контроль	Морфин 1 мг/кг	Морфин 1 мг/кг + атропин 2,7 мг/кг
30	3,46 ± 0,31	6,16 ± 0,84*	5,50 ± 0,55*
60	3,68 ± 0,54	6,42 ± 0,58*	5,46 ± 0,97*
90	3,52 ± 0,36	6,16 ± 0,88*	5,80 ± 0,51*

Совместное введение морфина и атропина значительно увеличивало показатели ЛП относительно группы контроля, при этом различий с группой морфина выявлено не было.

Влияние адьювантных препаратов на выраженность анальгетического эффекта морфина может быть обусловлено фармакодинамическим и фармакокинетическим взаимодействиями.

Дофаминовые рецепторы расположены постсинаптически и являются G-белок сопряженными, ингибируют аденилатциклазу, запуская при этом разветвленный пострецепторный каскад. Усиление анальгетического эффекта морфина галоперидолом может быть реализовано через ингибирование Ca^{2+} /кальмодулин-зависимой протеинкиназы II α (CaMKII α). Предполагается, что CaMKII α вызывает десенсibilизацию μ -опиоидных рецепторов (μ -ОР) в клетках, в нейронах ганглиев дорсальных корешков и в поверхностных пластинках дорсального рога спинного мозга [4], тем самым увеличивая показатели ЛП при моделировании соматогенной боли (тест отдергивания хвоста tail flick основан на спинальном флексорном рефлекс в ответ на воздействие теплового излучения). Метоклопрамид, как и галоперидол, является антагонистом D_2 рецепторов и в низких дозах используется в качестве антиэметика. Место его действия ограничено триггерной зоной *area postrema*, поэтому в выраженности влияния на анальгетическую активность морфина метоклопрамид уступает галоперидолу.

Морфин оказывает влияние на многие участки нервной системы, в том числе и на спинной мозг, где μ -ОР расположены как пре-, так и постсинаптически и участвуют в ноцицептивной передаче. Связь морфина с μ -ОР вызывает опосредованное уменьшение открытия потенциалзависимых кальциевых каналов, гиперполяризацию и снижение возбудимости нейронов. Взаимодействие с адьювантными препаратами может быть реализовано не только на уровне пострецепторных каскадов (галоперидол, метоклопрамид и др.),

но и связано с уровнем Ca^{2+} . Габапентин не связывается ни с одним из известных рецепторов нейротрансмиттеров, но взаимодействует с α_2 - δ -субъединицей потенциал-зависимых кальциевых каналов и снижает поток Ca^{2+} , играющего важную роль в возникновении боли. Можно предположить, что увеличение анальгетической активности морфина при взаимодействии с габапентином обусловлено сонаправленным влиянием на уровень внутриклеточного Ca^{2+} [5].

μ -ОР относятся к семейству GPCR. Присутствие морфина во внеклеточном пространстве вблизи μ -ОР может исказить структуру рецептора, создавая «карман», в который может проникнуть потенциально активная молекула [6]. Этим объясняется усиление анальгетического эффекта морфина при комбинировании его с некоторыми производными бензодиазепина. С другой стороны, в клинической практике зачастую наблюдается обратный эффект. Исследования K.V.S. Nemmani и J.S. Mogil (2003) [7] впервые предполагают, что диазепам ослабляет μ - и κ -опиоидную анальгезию посредством серотонинергических механизмов, в то время как антисеротонинергические агенты ослабляют μ - и κ -опиоидную анальгезию через (косвенные) ГАМКергические механизмы в ядре дорсального шва. Известно, что метаболизм морфина и мидазолама протекает с участием ферментов, относящихся к семейству глюкуронозилтрансфераз (UGT). Вероятнее всего, при их одновременном введении происходит увеличение периода полувыведения и, как следствие, уменьшение анальгетической активности морфина на фоне приема мидазолама протекает в меньшей степени, чем на фоне введения диазепама, который метаболизируется при участии системы цитохромов (CYP3A и CYP2C19).

Альфа-2-адренорецепторы и μ -ОР экспрессируются в одной популяции нейронов, также подтверждено наличие физической связи между ними. Их взаимодействие приводит к образованию гетеромерных комплексов с измененными функциональными и лигандсвязывающими свойствами. Это может объяснять анальгетический синергизм между морфином и полным агонистом α_2 -адренорецепторов клонидином [8].

Механизм морфиновой анальгезии на уровне спинного мозга (СМ) можно представить в виде цепи событий [9]: введение морфина → активация M_2 , M_4 -холинергических рецепторов СМ → образование оксида азота в дорсальном роге СМ → анальгезия. Следовательно, в высоких дозах неселективный М-холиноблокатор атропин может значительно снижать анальгетический эффект морфина. В результате проведенного исследования атропин при совместном введении с морфином

не оказывал влияния на показатели ЛП отдергивания хвоста, что может быть связано с выбранной низкой дозой холиноблокатора.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследования влияния адъювантных препаратов на анальгетические свойства морфина в субанальгетической дозе (1 мг/кг) выявлена неоднородность их эффектов.

Блокаторы D₂ рецепторов галоперидол (0,45 мг/кг) и метоклопрамид (5 мг/кг) проявляют синергизм с антиноцицептивным эффектом морфина.

Противоэпилептический препарат габапентин (90 мг/кг) усиливает анальгетический эффект морфина.

Агонист бензодиазепиновых рецепторов диазепам (1 мг/кг) блокирует обезболивающие свойства морфина, в то время как мидазолам (0,3 мг/кг) не влияет на его антиноцицептивный эффект.

Агонист α_2 -адренорецепторов клонидин (1 мг/кг) потенцирует анальгетические свойства опиоида.

M-холиноблокатор атропин в выбранной дозе 2,7 мг/кг не влияет на анальгетические свойства морфина.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Воронина Т.А., Гузеев Л.С. / Voronina T.A., Guzeyev L.S. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Методические рекомендации по изучению анальгетической активности лекарственных средств / Rukovodstvo

po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. Metodicheskiye rekomendatsii po izucheniyu anal'geticheskoy aktivnosti lekarstvennykh sredstv [Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. Methodical recommendations for the study of the analgesic activity of drugs] / под редакцией А.Н. Миронова / A.N. Mironov (ed.). – М.: Гриф и К, 2012. – 944 с. (In Russ.; abstr. in Engl.).

2. Leppert W., Okulicz-Kozaryn I., Kaminska E., et al. Analgesic effects of morphine in combination with adjuvant drugs in rats // Pharmacology. – 2014. – Vol. 94 (5-6). – 207–213.

3. Spasov A.A., Grechko O.Yu., et al. Analgesic activity of the kappa opioid receptor agonist – RU-1205 in rats // Journal of clinical and health sciences. – 2018. – Vol. 3 (2). – P. 13–18.

4. Brüggemann I., et al. Colocalization of the mu-opioid receptor and calcium/calmodulin-dependent kinase II in distinct pain-processing brain regions // Brain Res Mol Brain Res. – 2000. – No. 85. – P. 239–250.

5. Matthews E.A., Dickenson A.H. A combination of gabapentin and morphine mediates enhanced inhibitory effects on dorsal horn neuronal responses in a rat model of neuropathy // Anesthesiology. – 2002. – Vol. 96 (3). – P. 633–640.

6. Staus D.P., Strachan R.T., et al. Allosteric nanobodies reveal the dynamic range and diverse mechanisms of G-protein-coupled receptor activation // Nature. – 2016. – Vol. 535 (7612). – P. 448–452.

7. Nemmani K.V., Mogil J.S. Serotonin-GABA interactions in the modulation of mu- and kappa-opioid analgesia // Neuropharmacology. – 2003. – Vol. 44 (3). – P. 304–310.

8. Tajerian M., Millecamps M., et al. Morphine and clonidine synergize to ameliorate low back pain in mice // Pain Res Treat. – 2012. – Vol. 2012. – P. 150842. – doi: 10.1155/2012/150842.

9. Naser P.V., Kuner R. Molecular, cellular and circuit basis of cholinergic modulation of pain // Neuroscience. – 2018. – No. 387. – P. 135–148.

Контактная информация

Семенова Юлия Викторовна – ассистент кафедры фармакологии и биоинформатики, Волгоградский государственный медицинский университет, e-mail: j_semenova_pharm@mail.ru