

DOI: <https://doi.org/10.22263/2312-4156.2023.1.31>

Роль амидов жирных кислот в изменении ноцицептивной чувствительности и паттернов походки у здоровых крыс и крыс с периферической нейропатией при фармакологической блокаде рецепторов GPR18

А.С. Доронькина¹, И.П. Жаворонок¹, А.Л. Михальчук², А.Ю. Молчанова¹, В.Г. Богдан³

¹Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси, г. Минск, Республика Беларусь

²Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, г. Минск, Республика Беларусь

³Отделение медицинских наук Национальной академии наук Беларуси, г. Минск, Республика Беларусь

Вестник ВГМУ. – 2023. – Том 22, №1. – С. 31-41.

The role of fatty acid amides in the change of nociceptive sensitivity and gait patterns in healthy rats and in rats with peripheral neuropathy under pharmacological blockade of GPR18 receptors

A.S. Doronkina¹, I.P. Zhavoronok¹, A.L. Mikhal'chuk², A.Yu. Molchanova¹, V.G. Bogdan³

¹Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

²Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

³Department of Medical Sciences of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

Vestnik VGMU. 2023;22(1):31-41.

Резюме.

Цель работы – изучить влияние амидов жирных кислот на ноцицептивную чувствительность и паттерны походки при фармакологической блокаде рецепторов GPR18 у здоровых животных и крыс с периферической нейропатией. Материал и методы. Исследования выполнены на белых крысах-самцах линии Wister (n=86), разделенных на 11 групп. Изучено влияние амидов жирных кислот с этаноламином и глицином при блокаде рецепторов GPR18 после введения антагониста PSB-CB5 на параметры походки (площадь и интенсивность отпечатка, а также скорость переноса задних конечностей), ноцицептивные реакции у крыс в норме и у животных с экспериментальной периферической нейропатией.

Результаты. Однократное внутрибрюшинное введение интактным крысам антагониста мембранных рецепторов GPR18, связанных с G-белком, в дозе 1 мг/кг не вызывало достоверных изменений порога и латентного периода ноцицептивной реакции, а также паттернов походки. Инъекция одного из амидов жирных кислот (пальмитоилэтноламида, стеароилэтноламида и пальмитоилглицинамида) в дозе 1,5 мг/кг крысам после моделирования периферической нейропатии приводила к достоверному снижению выраженности ноцицептивной реакции на механический и термический стимул, оказывая тем самым анальгетическое действие, которое было подтверждено и при анализе походки. На фоне блокады рецепторов GPR18 у крыс с нейропатией пальмитоилглицинамида доказывал выраженный обезболивающий эффект, что отражено в достоверных изменениях значений ноцицептивной чувствительности, а также исследуемых параметрах походки. Однако после введения пальмитоилэтноламида животным с блокадой рецепторов GPR18 достоверные результаты получены лишь при регистрации латентного периода ноцицептивной реакции и площади отпечатка, тогда как после введения стеароилэтноламида статистически значимых данных получено не было.

Закключение. Показано, что выраженное анальгетическое действие после введения пальмитоилэтноламида и стеароилэтноламида опосредовано через взаимодействие с орфанными рецепторами. В то же время антиноцицептивное действие пальмитоилглицинамида, вероятно, реализуется путем активации иных, не орфанных, рецепторов.

Ключевые слова: пальмитоилэтаноламид, стеароилэтаноламид, пальмитоилглицинамид, паттерны походки, ноцицепция, нейропатия, анальгетический эффект, амиды жирных кислот, орфанные рецепторы.

Abstract.

Objectives. To study the effect of fatty acid amides on nociceptive sensitivity and gait patterns during pharmacological blockade of GPR18 receptors in healthy animals and in rats with peripheral neuropathy.

Material and methods. The studies were carried out on white male Wister rats (n=86), divided into 11 groups. The effects of fatty acid amides with ethanolamine and glycine upon blockade of GPR18 receptors after the administration of a PSB-CB5 antagonist on gait parameters (footprint area and intensity, as well as hind limb transfer rate), nociceptive reactions in normal rats and in animals with experimental peripheral neuropathy were studied.

Results. Single intraperitoneal injections of the G-protein-coupled membrane receptors antagonist GPR18 at a dose of 1 mg/kg to intact rats did not cause any significant changes in Randall – Sellitto test, Hot-plate test and gait patterns. Injections of one of the fatty acid amides (palmitoylethanolamide, stearoylethanolamide, palmitoylglycinamide) at a dose of 1.5 mg/kg to rats with experimental peripheral neuropathy caused a significant decrease in the nociceptive response to mechanical and thermal stimuli, thereby providing an analgesic effect, which was also confirmed by gait analysis. Against the background of GPR18 receptors blockade in rats with neuropathy, palmitoylglycinamide had a pronounced analgesic effect, which is reflected in significant changes in the values of nociceptive sensitivity, as well as the gait parameters studied. However, after the administration of palmitoylethanolamide to animals with GPR18 receptors blocked, reliable results were obtained only when test Hot-plate and fingerprint area were registered, whereas after the introduction of stearoylethanolamide no statistically significant data were obtained.

Conclusions. It has been shown that the pronounced analgesic effect after the administration of palmitoylethanolamide and stearoylethanolamide is mediated through the interaction with orphan receptors. At the same time, the antinociceptive effect of palmitoylglycinamide probably occurs through the activation of other, non-orphan, receptors.

Keywords: *palmitoylethanolamide, stearoylethanolamide, palmitoylglycinamide, gait patterns, nociception, neuropathy, analgesic effect, fatty acid amides, orphan receptors.*

Введение

В настоящее время во всем мире от различных проявлений нейропатической боли страдает до 15% взрослого населения, в реальности же цифры могут быть выше, так как большинство пациентов с начальными признаками аллодинии не обращаются к врачу [1]. В связи с этим поиск субстанций/препаратов, эффективно действующих при боли различного генеза, является актуальным в современной медицине и биологии. Перспективными соединениями для купирования болевого синдрома могут стать липиды, которые широко представлены в организмах животных и человека [2]. Большинство таких липидов выполняет одновременно несколько функций: являются структурными компонентами клеток (мембраны, жировые включения, миелиновые оболочки, др.), участвуют в процессах энергетического обмена, выполняют сигнальные функции др. [3].

Одной из активно исследуемых групп липидов являются этаноламиды жирных кислот (FAEAs), они играют сигнальную роль в клетках животных, растений, а также в более примитивных организмах [4]. По литературным данным,

известно о более чем 70 эндогенных сигнальных молекулах, которые относятся к данной группе липидов и рассматриваются сегодня в качестве средств либо мишеней терапевтического действия. Они участвуют в модуляции высвобождения нейротрансмиттеров, функционировании клеточных энергетических систем и вовлечены в регуляцию различных процессов, включая боль и воспаление [3].

Особый интерес в этой связи представляют структурные аналоги «эндоканнабиноида» арахидоноил этаноламида или анандамида (AEA) – пальмитоилэтаноламид (PEA) и стеароилэтаноламид (SEA), применение которых вызывает схожие с AEA терапевтические эффекты. В то же время они являются наиболее широко распространенными в организме FAEAs, но в отличие от своего конгенера AEA не взаимодействуют со специфическими «каннабиноидными» рецепторами и не вызывают психотропного действия [2, 5].

Относительно недавно в организме млекопитающих было идентифицировано другое семейство молекул, которые отличаются от FAEAs, тем, что вместо этаноламина к их жирной кислоте присоединены транзиттерные аминокислоты

– глицин, серин, аланин или допамин, формируя, таким образом амиды жирных кислот с аминокислотами (FAAs), например, пальмитоилглицинамид (PGlyA), пальмитоилаланинамид, стеариоглицинамид и др. [6]. Большинство FAAs по-разному распространены в организме (в том числе и в ЦНС) и оказывают ряд схожих с FAAs физиологических эффектов, в то же время механизмы действия обнаруженных соединений все еще не до конца изучены [7].

В настоящее время амиды жирных кислот (FAAs) представляют интерес как в качестве модуляторов физиологических функций, так и в роле потенциальных фармакологических агентов модуляции активности мембранных рецепторов, сопряженных с G-белком орфанных рецепторов (GPR18, GPR55), ядерных PPAR α -рецепторов и «каннабиноидных рецепторов» CBR1, CBR2, а также каналы переменного рецепторного потенциала TRPV1 [8-10]. Выяснению возможного участия орфанных рецепторов в реализации антиноцицептивного действия указанных FAAs посвящена данная работа.

Цель работы – изучить влияние FAAs на ноцицептивную чувствительность и паттерны походки при фармакологической блокаде рецепторов GPR18 у здоровых животных и крыс с периферической нейропатией.

Материал и методы

Исследования выполнены на белых крысах-самцах линии Wister (n=86) с массой тела 200-220 г. Все животные находились в контролируемых условиях окружающей среды на стандартном рационе, имели свободный доступ к воде и пище. Эксперименты проводили с соблюдением правовых и этических норм обращения с животными в соответствии с национальными и международными стандартами качества планирования и проведения исследований на лабораторных животных. Протокол биоэтической комиссии Института физиологии НАН Беларуси № 1 от 02.02.2022 [11].

Исследуемые вещества – FAAs: FAAs (PEA, SEA) и FAAs (PGlyA) (синтезированы в лаборатории химии липидов ИБОХ НАН Беларуси). PSB-CB5 антагонист мембранных рецепторов GPR18, сопряженного с G-белком (произведен Tocris, Великобритания). FAAs, а также антагонист GPR18 (PSB-CB5) являются труднорастворимыми соединениями, поэтому для их введения использовали комплексный растворитель,

состоящий из Tween 80 (Sigma, США), этанола и апирогенного физиологического раствора в соотношении 1:1:8. Введение PSB-CB5 осуществляли внутривентриально в дозе 1 мг/кг, а через 10 минут вводили один из FAAs (PEA, SEA, PGlyA) также внутривентриально, в дозе 1,5 мг/кг.

Животные были разделены на следующие группы: интактные + PSB-CB5 (n=7), лигирование (n=10), ложнооперированные (n=7), лигирование + растворитель (n=7), лигирование + PEA (n=10), лигирование + SEA (n=10), лигирование + PGlyA (n=7), лигирование + PSB-CB5 (n=7), лигирование + PSB-CB5 + PEA (n=7), лигирование + PSB-CB5 + SEA (n=7), лигирование + PSB-CB5 + PGlyA (n=7).

Моделирование периферической нейропатии проводили под общим наркозом (тиопентал натрия («Синтез», Россия, 20 мг/кг, внутривенно) посредством тройного лигирования седалищного нерва [4]. Выбрасывали шерсть в области бедра и голени крысы и обрабатывали подготовленное поле 5% спиртовым раствором йода. Для местной анестезии использовали лидокаина гидрохлорид 1% раствор (Борисовский завод медицинских препаратов, Беларусь, 30-40 мкл на крысу). Разрез кожи и нижележащих тканей производили скальпелем на уровне верхней трети бедра до трифуркации, длина разреза составляла 0,8-1,0 см, мышечный слой раздвигали пинцетом, минимально травмируя мышечные волокна, находили седалищный нерв и накладывали на него лигатуры в трех местах на расстоянии 1 мм друг от друга, использовали нить «Сургикрол», USP 3/0 («Футберг», Беларусь). Кожу сшивали непрерывным матрацным швом. Готовый шов обрабатывали 1% раствором бриллиантовым зеленым (Белмедпрепараты, Беларусь). Ложнооперированным животным производили только разрез кожи и раздвигали мышцы без лигирования нервных волокон с последующим ушиванием краев раны. Для предупреждения развития инфекции животным подкожно вводили растворенный в апирогенном физическом растворе антибиотик цефтриаксон (Борисовский завод медицинских препаратов, Беларусь) в дозе 200 мг/кг однократно непосредственно после оперативного вмешательства. После операции до выхода из наркоза животные находились под визуальным наблюдением.

Измерение параметров походки крыс выполнены до и на 1, 7, 14, 21, 30, 60-е сутки после лигирования с помощью аппаратно-программного комплекса Catwalk TX (Noldus, Нидерланды)

[12, 13]. Данный комплекс состоит из закрытого коридора на стеклянной пластине, по которому грызун перемещается с одной стороны на другую. Зеленый свет проникает через стеклянную пластину и полностью отражается от нее. Свет способен проникать только в те места, где лапа животного соприкасается со стеклянным полом, и, как следствие, свет рассеивается [14].

Анализ данных с Catwalk XT включал следующие параметры:

1. Площадь отпечатка (см^2) – это общая площадь пластины, с которой соприкасается лапа во время фазы стойка.

2. Скорость переноса лапы (см/с) – это стремительность отрыва лапы и вновь касание стеклянной пластины.

3. Интенсивность отпечатка – это площадь контакта лапы в момент максимального соприкосновения лапы с поверхностью. Этот параметр выражается в абсолютных единицах измерения (а.е.).

Пробег считался удачным, когда крыса входила в коридор и плавно перемещалась по пластине к выходу в другом конце коридора с продолжительностью пробежки менее 5 сек и максимальным отклонением менее 75%. Для каждого животного было зарегистрировано три соответствующих пробега [12].

В эти же сроки измеряли порог ноцицептивной реакции в граммах (ПНР) с помощью теста Рандалла–Селитто, путем измерения давления вершины пластикового конуса на стопу экспериментального животного, при котором отмечали специфическую ноцицептивную реакцию (отдергивание лапы или вокализация). Тест проводили поочередно на обеих задних конечностях каждого животного [15]. В тесте Hot plate измеряли латентный период ноцицептивной реакции в секундах (ЛПНР) – время с момента помещения животного на горячую пластинку (50°C) до выявления ноцицептивной реакции (облизывание задней лапы, вокализация, попытка выпрыгнуть из камеры). Тесты на измерение ноцицептивной чувствительности проводили троекратно [15].

Анализ данных выполняли с помощью программ Microsoft Excel, Origin и Statistica 10. Проверку гипотезы о нормальном распределении количественных показателей осуществляли с помощью программы Origin 7.0 по критерию Шапиро–Уилка ($p < 0,05$). Данные представлены в виде медианы (Me) и интервального размаха с указанием 25-го и 75-го перцентилей. Анализ статисти-

ческой значимости количественных признаков определяли с помощью непараметрических тестов: Уилкоксона для зависимых и Манна–Уитни для независимых выборок в парных сравнениях. Изменения считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Для анализа взаимосвязи двух количественных признаков использовали метод ранговой корреляции Спирмена. Изменения считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В ходе исследования установлено, что внутривентрикулярное введение PSB-CB5 здоровым животным в дозе 1 мг/кг не приводило к статистически значимым изменениям значений ноцицептивной чувствительности и параметров походки. Зарегистрированы следующие значения ПНР: до введения антагониста рецепторов GPR18 131,0 (123,0-132,0) г, после 114,0 (109,0-119,0) г ($p > 0,08$); ЛПНР: до введения 22,4 (18,8-23,8) с, после 20,2 (16,3-21,5) с ($p > 0,39$); усредненной площади отпечатка: до инъекции 0,7 (0,6-0,8) см^2 , после 0,6 (0,4-0,7) см^2 ($p > 0,23$); интенсивности отпечатка: до введения PSB-CB5 142,6 (134,4-155,0), после 146,5 (110,2-164,0) ($p > 0,61$); скорости переноса задних конечностей: до инъекции 96,4 (87,2-97,8) см/с , после 96,5 (75,3-112,0) см/с ($p > 1,00$).

Периферическая нейропатия седалищного нерва у крыс-самцов линии Wistar приводила к развитию у экспериментальных животных механической гипералгезии. Наиболее выраженные и достоверные ($p < 0,05$) изменения были зарегистрированы на 7-е сутки после операции, отмечено снижение ПНР на 29,3% – с 127,5 (123,0-130,8) г до 90,0 (87,0-93,0) г; $p < 0,0002$ (рис. 1).

Визуально в эти сроки наблюдали следующие симптомы: частое облизывание ипсилатеральной конечности, хромоту и постральную асимметрию. Дальнейший мониторинг (с 8-х по 60-е сутки после операции) показал постепенное повышение значений ПНР и уменьшение выраженности клинической картины (рис. 1). Данные регистрации ПНР неоперированной (контралатеральной) задней конечности, как и обеих конечностей ложнооперированных животных свидетельствовали об отсутствии достоверных изменений исследуемого показателя.

Однократное внутривентрикулярное введение FAAs крысам с периферической нейропатией в дозе 1,5 мг/кг на 7-е сутки существенно осла-

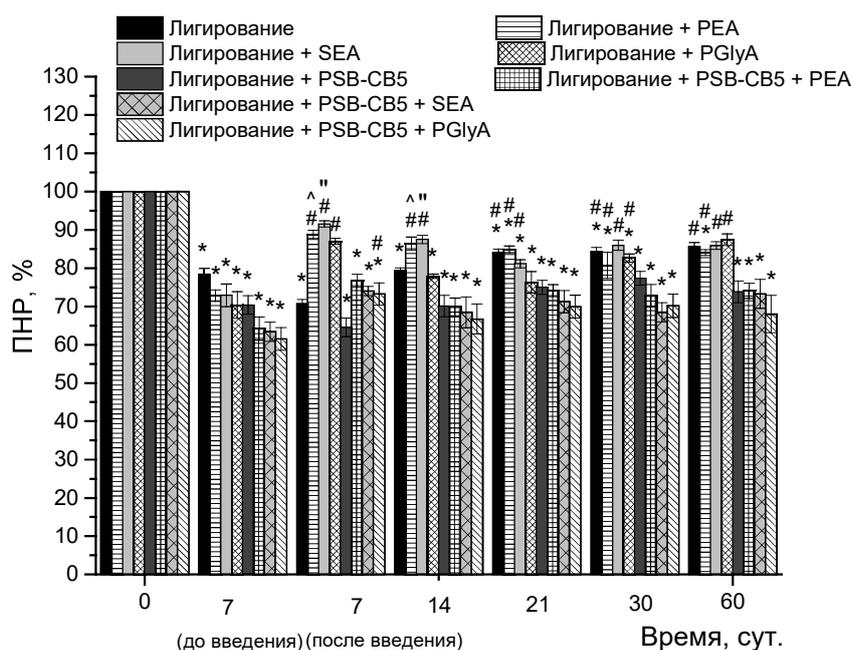


Рисунок 1 – Изменение порога ноцицептивной реакции ипсилатеральной конечности у крыс с периферической нейропатией после внутрибрюшинного введения GPR18 (PSB-CB5) (1 мг/кг) и FAAs (SEA, PGlyA) (1,5 мг/кг) на 7-е сутки: * – $p < 0,05$ по сравнению со значениями до операции; # – $p < 0,05$ по сравнению со значениями на 7-е сутки до введения; ^ – $p < 0,05$ по сравнению с группой «лигирование + PSB-CB5 + PEA»; “ – $p < 0,05$ по сравнению с группой «лигирование + PSB-CB5 + SEA»

бляло вызванную лигированием седалищного нерва механическую гипералгезию (рис. 1). Применение SEA вызывало достоверное увеличение ПНР в ипсилатеральной конечности на 26,2 %; до 115,0 (111,0-117,0 г; $p < 0,007$ по сравнению с таковым до введения (с 88,0 (85,0-98,5) г, рис. 1). Инъекция в аналогичных условиях эксперимента PEA и PGlyA приводила к увеличению данного показателя на 22,8%; с 95,5 (91,3-100,8) г до 115,0 (112,3-120,0) г; $p < 0,005$ и на 24,7%; с 88,0 (81,0-93,0) г до 110,0 (109,0-113,0) г; $p < 0,02$ соответственно (рис. 1).

После инъекции, крысам с лигированием седалищного нерва, PSB-CB5 антагониста рецепторов GPR18, через 60 минут отмечалось достоверное снижение ПНР на 33,5%; с 126,0 (122,0-128,0) г; до 82,0 (73,0-86,0) г; $p < 0,02$ по сравнению с фоновыми значениями (рис. 1).

В аналогичных экспериментальных условиях следующей серии животных антагонист GPR18 (PSB-CB5) вводили за 10 минут до одного из исследуемых FAAs. Фармакологическая блокада GPR18 сопровождалась повышением ПНР ипсилатеральной конечности, независимо от примененного FAA, однако достоверные раз-

личия отмечены исключительно в группе с последующим введением PGlyA, увеличение на 19,1%; с 89,0(72,0-91,0) до 102,0 (97,0-108,0) г; $p < 0,02$ (рис. 1).

У животных с экспериментальной нейропатией оценивали антиноцицептивное действие исследуемых соединений в ответ на термический стимул в тесте Hot plate. Лигирование седалищного нерва на 7-е сутки приводило к достоверному снижению ЛПНР на 34,5%; с 20,4 (18,8-21,4) с до 13,6 (11,9-14,7) с; $p < 0,005$, что указывает на развитие аллодинии (рис. 2).

Интраперитонеальное введение исследуемых FAAs приводило к анальгизирующему действию, которое выражалось в достоверном изменении ЛПНР. Введенный PEA, в данном тесте, вызывал повышение на 31,7%; с 12,9 (11,3-15,1) с до 16,9 (15,5-18,4) с; $p < 0,005$ по отношению к значениям до введения (рис. 2). SEA вызвал увеличение значений исследуемого показателя на 53,3%; с 16,5 (15,3-18,7) с до 27,2 (23,7-28,9) с; $p < 0,007$ (рис. 2). Тогда как у крыс, которым вводили PGlyA, ЛПНР возрос лишь на 17,4%; с 14,6 (13,8-15,7) с до 17,4 (16,3-19,1) с; $p < 0,04$ (рис. 2). При этом восстановления данного показателя до исходных значений

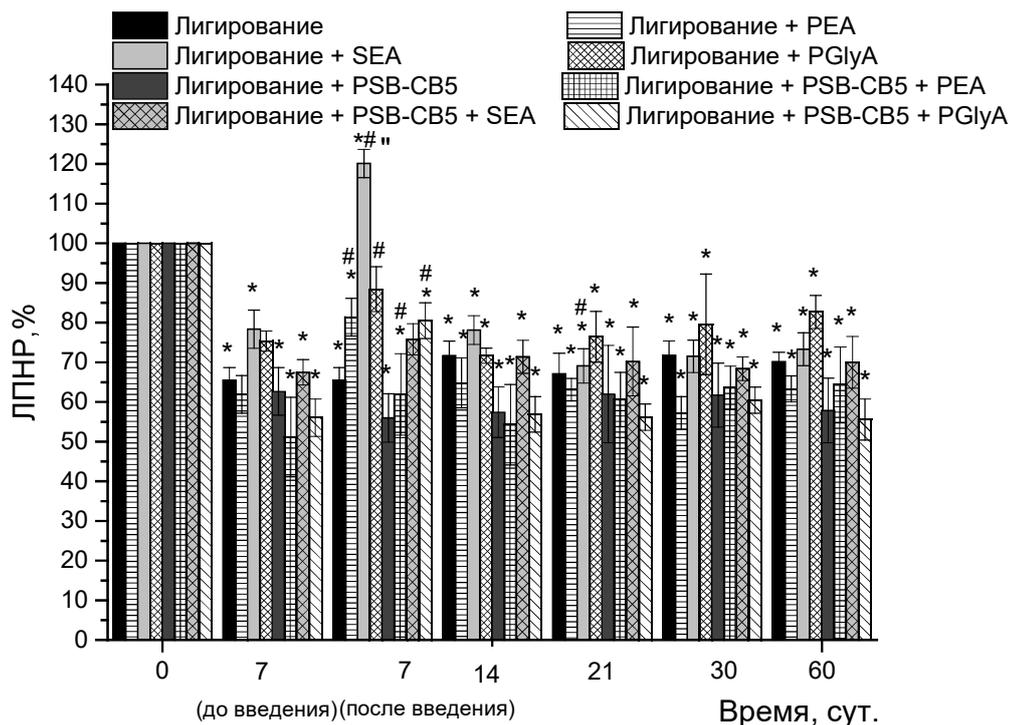


Рисунок 2 – Изменение латентного периода ноцицептивной реакции у крыс с периферической нейропатией после внутрибрюшинного введения GPR18 (PSB-CB5) (1 мг/кг) и FAAs (SEA, PGlyA) (1,5 мг/кг) на 7-е сутки: * – $p < 0,05$ по сравнению со значениями до операции; # – $p < 0,05$ по сравнению со значениями на 7-е сутки до введения; “ – $p < 0,05$ по сравнению с группой «лигирование + PSB-CB5 + SEA»

на 60-е сутки не происходило при неприменении ни одного из вышеупомянутых веществ (рис. 2).

Установлено, что после введения PSB-CB5 (1 мг/кг) крысам с периферической нейропатией снизился показатель ЛПНР на 44,1%; с 22,1 (18,7-30,4) с до 14,1 (12,6-15,7) с; $p < 0,02$ относительно значений до операции (рис. 2).

Заблаговременная инъекция PEA с последующим введением PSB-CB5 приводила к достоверному увеличению ЛПНР на 20,9%; с 12,6 (9,3-15,1) до 15,9 (11,8-18,9) с; $p < 0,02$, тогда как в аналогичных условиях PGlyA повышал вышеупомянутый показатель на 24,5%; с 15,5 (12,6-16,6) с до 21,4 (17,4-24,1) с; $p < 0,02$ (рис. 2). Инъекция SEA на фоне фармакологической блокады рецепторов GPR18 не вызывала достоверных показателей ЛПНР и ПНР у животных с экспериментальной нейропатией (рис. 2). Внутрибрюшинное введение крысам смеси растворителей на фоне нейропатии (по аналогичной схеме), не влияло на величину порога и латентного периода ноцицептивной реакции.

У лабораторных животных всех экспериментальных групп регистрировали изменения показателей походки с использованием аппа-

ратно-программного комплекса CatWalk TX. В экспериментальных группах крыс после лигирования седалищного нерва на 7-е сутки было зарегистрировано изменение интенсивности контакта ипсилатеральной конечности с платформой на 17,5%; с 189,0 (179,0-195,0) до 144,0 (139,0-149,2); $p < 0,02$ по сравнению со значениями до моделирования периферической нейропатии, что подтверждает нарастание механической гипералгезии. Зафиксировано сокращение площади отпечатка травмированной конечности в это же время на 30,6%; с 1,2 (0,9-1,2) $см^2$ до 0,7 (0,7-0,8) $см^2$; $p < 0,05$ (рис. 3). Однако подобного эффекта при анализе показателей походки на здоровой (контралатеральной) конечности обнаружено не было.

Внутрибрюшинное введение (в указанном ранее растворителе) экспериментальным животным FAAs приводило к повышению значений исследуемых параметров походки (рис. 3-5).

Через час после введения FAAs в дозе 1,5 мг/кг отмечалось достоверное увеличение площади отпечатка ипсилатеральной конечности на 32,5%; с 0,6 (0,4-0,7) $см^2$ до 0,9 (0,7-1,0) $см^2$; $p < 0,03$ для PEA, на 32,8%; с 0,8 (0,5-0,9) $см^2$ до 1,1 (1,0-1,3) $см^2$; $p < 0,02$ для SEA и на 15,4%; с

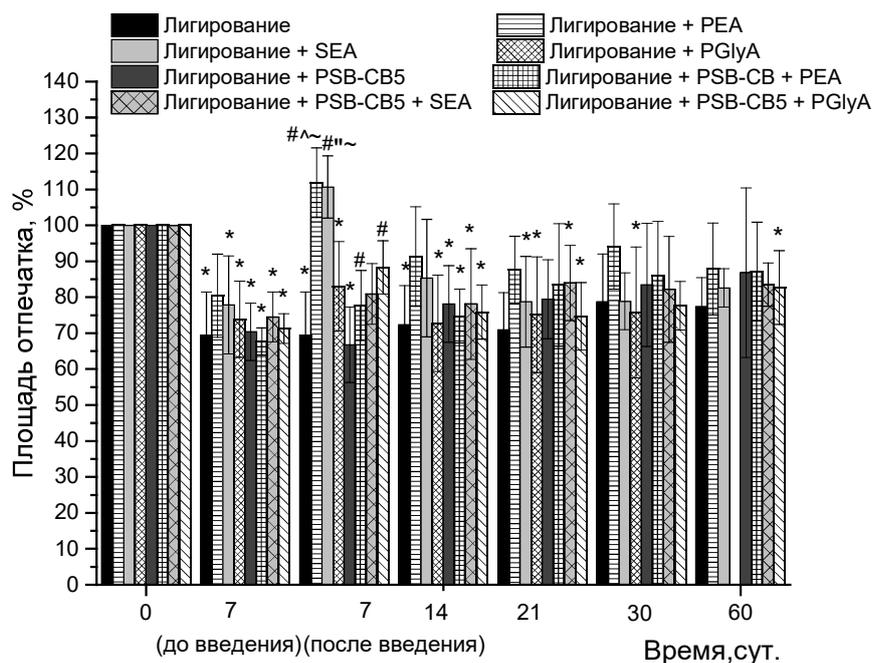


Рисунок 3 – Изменение площади отпечатка ипсилатеральной конечности у крыс с периферической нейропатией после внутрибрюшинного введения GPR18 (PSB-CB5) (1 мг/кг) и FAAs (PEA, SEA, PGlyA) (1,5 мг/кг) на 7-е сутки: * – $p < 0,05$ по сравнению со значениями до операции; # – $p < 0,05$ по сравнению со значениями на 7-е сутки до введения; ^ – $p < 0,05$ по сравнению с группой «лигирование + PSB-CB5 + PEA»; “ – $p < 0,05$ по сравнению с группой «лигирование + PSB-CB5 + SEA»; ~ – $p < 0,05$ по сравнению с группой «лигирование + PSB-CB5»

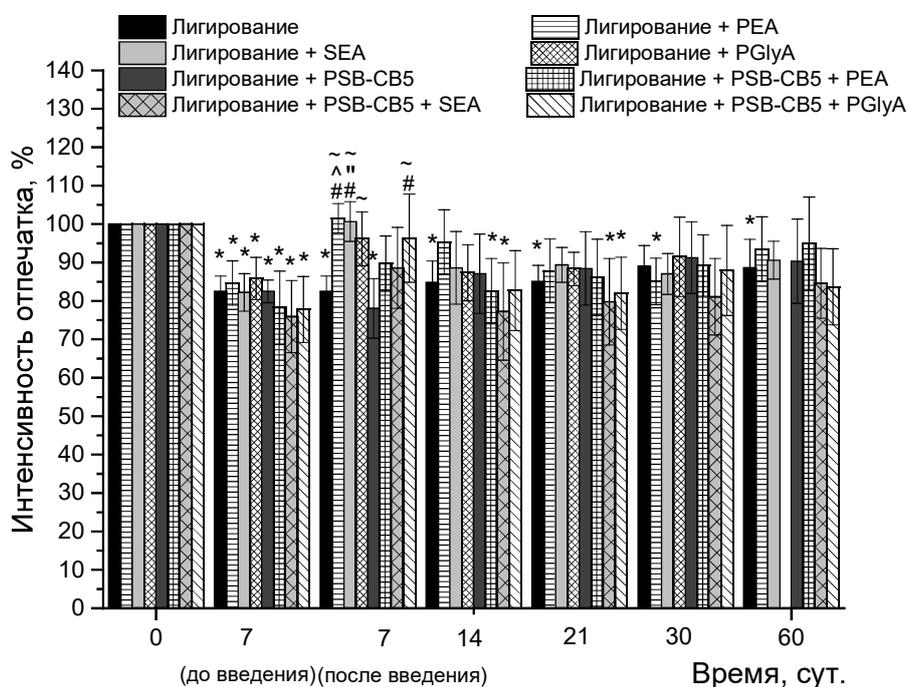


Рисунок 4 – Изменение интенсивности отпечатка ипсилатеральной конечности у крыс с периферической нейропатией после внутрибрюшинного введения GPR18 (PSB-CB5) (1 мг/кг) и FAAs (PEA, SEA, PGlyA) (1,5 мг/кг) на 7-е сутки: * – $p < 0,05$ по сравнению со значениями до операции; # – $p < 0,05$ по сравнению со значениями на 7-е сутки до введения; ^ – $p < 0,05$ по сравнению с группой «лигирование + PSB-CB5 + PEA»; “ – $p < 0,05$ по сравнению с группой «лигирование + PSB-CB5 + SEA»; ~ – $p < 0,05$ по сравнению с группой «лигирование + PSB-CB5»

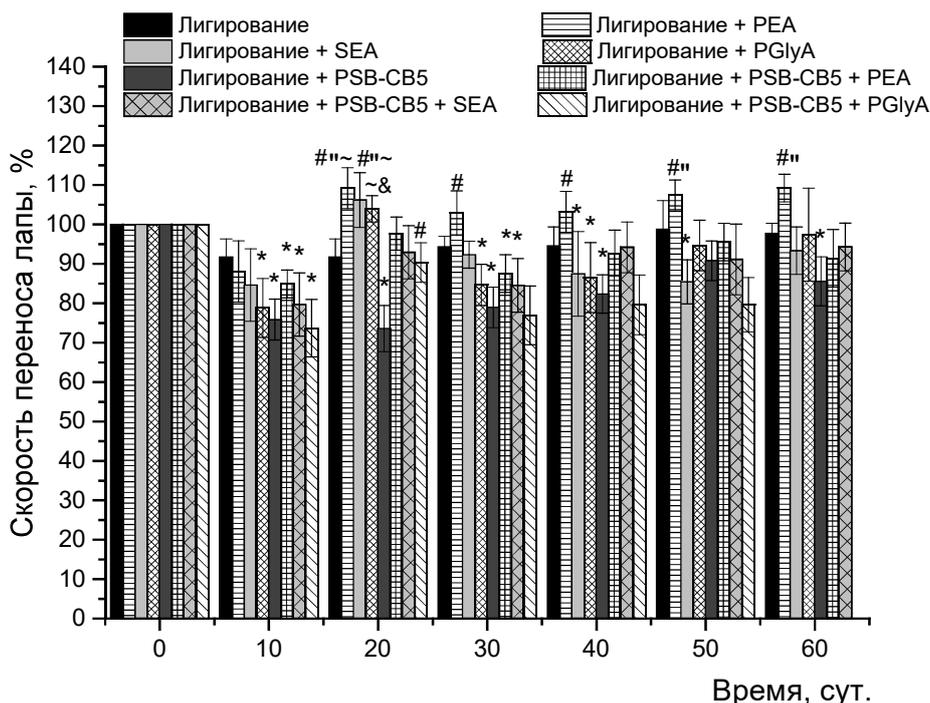


Рисунок 5 – Изменение скорости переноса ипсилатеральной конечности у крыс с периферической нейропатией после внутрибрюшинного введения GPR18 (PSB-CB5) (1 мг/кг) и FAAs (PEA, SEA, PGlyA) (1,5 мг/кг) на 7-е сутки: * – $p < 0,05$ по сравнению со значениями до операции; # – $p < 0,05$ по сравнению со значениями на 7-е сутки до введения; “ – $p < 0,05$ по сравнению с группой «лигирование +PSB-CB5 + SEA»; ~ – $p < 0,05$ по сравнению с группой «лигирование +PSB-CB5»; & – $p < 0,05$ по сравнению с группой «лигирование +PSB-CB5+ PGlyA»

0,6 (0,5-0,6) $см^2$ до 0,5(0,5-0,8) $см^2$; $p < 0,05$ для PGlyA (рис. 3).

Также было зафиксировано статистически значимое увеличение интенсивности отпечатка ипсилатеральной конечности на 16,9%; с 149,8 (127,9-159,5) до 167,7 (157,8-186,7); $p < 0,02$, на 18,5%; с 139,0 (133,6-147,8) до 176,6 (147,9-187,6); $p < 0,02$ и на 12,1%; с 138,8 (116,5-149,9) до 151,9 (126,9-167,3); $p < 0,02$ по сравнению со значениями до введения PEA, SEA или PGlyA соответственно (рис. 4).

Схожая динамика отмечена при анализе скорости переноса ипсилатеральной конечности, она возрастала по сравнению со значениями до введения на 21,1%; с 85,9 (73,8-91,3) $см/с$ до 104,7 (92,3-117,6) $см/с$; $p < 0,02$ для PEA, на 22,3%; с 97,1 (81,8-101,9) $см/с$ до 104,9 (100,4-109,1) $см/с$; $p < 0,05$ для SEA и на 24,2%; с 87,5 (65,8-97,0) $см/с$ до 109,3 (104,2-114,4) $см/с$; $p < 0,02$ для PGlyA (рис. 5).

Применение PSB-CB5 приводило к достоверному снижению площади отпечатка на 33,3%; с 0,5 (0,4-0,7) $см^2$ до 0,4 (0,2-0,5) $см^2$; $p < 0,03$, ин-

тенсивности отпечатка на 27,8%; с 138,3 (130,6-155,3) $см^2$ до 107,0 (99,3-120,1) $см^2$; $p < 0,02$, а также скорости переноса ипсилатеральной конечности на 20,3%; с 97,2 (88,1-111,5) до 95,7 (91,2-99,1); $p < 0,03$ (рис. 3-5).

Дополнительно отмечено достоверное увеличение показателя площади отпечатка ипсилатеральной конечности после фармакологической блокады рецепторов GPR18 с последующим введением FAAs (PEA, PGlyA) (1,5 мг/кг) на фоне вызванной лигированием нерва гипералгезии – 15,9%; с 0,4 (0,3-0,4) $см^2$ до 0,5 (0,4-0,5) $см^2$; $p < 0,05$ и 17,0%; с 0,7 (0,7-0,8) $см^2$ до 0,9 (0,9-1,1) $см^2$; $p < 0,03$ по сравнению со значениями до введения (рис. 3).

Также было зафиксировано статистически значимое увеличение интенсивности отпечатка на 23,9%; с 108,8 (100,2-139,1) до 166,0 (102,8-191,1); $p < 0,03$ (рис. 4) и скорости переноса ипсилатеральной конечности на 22,6%; с 80,6 (75,8-99,1) $см/с$ до 101,1 (93,6-116,0) $см/с$; $p < 0,04$ после введения PSB-CB5 (1 мг/кг) в сочетании с PGlyA

Таблица 1 – Сводная таблица коэффициентов корреляции у групп крыс с периферической нейропатией

1 группа сравнения	2 группа сравнения	PEA	SEA	PGlyA	PSB-CB5+ PEA	PSB-CB5+ SEA	PSB-CB5+ PGlyA
Площадь отпечатка	1	0,61	0,73	0,95*	0,90*	0,97*	0,90*
	2	0,42	0,98*	0,95*	0,92*	0,91*	0,89*
Интенсивность отпечатка	1	0,81*	0,87*	0,96*	0,88*	0,98*	0,84*
	2	0,80*	0,83*	0,92*	0,90*	0,94*	0,89*
Скорость переноса лапы	1	0,37	0,77*	0,84*	0,83*	0,78*	0,94*
	2	0,02	0,91*	0,77*	0,81*	0,65	0,93*

Примечание: группы сравнения: 1 – ПНР, 2 – ЛПНР; * – $p < 0,05$ по сравнению с группой сравнения.

(1,5 мг) по сравнению со значениями до введения. Достоверных изменений в вышеупомянутых показателях после введения PEA и SEA на фоне блокады GPR18 обнаружено не было (рис. 4-5).

Для оценки согласованности изменений ноцицептивной чувствительности и параметров походки проведен анализ с расчетом коэффициентов корреляции Спирмэна. Результаты представлены в таблице 1.

Таким образом, полученные коэффициенты корреляции показывают наличие статистической взаимосвязи и согласованности между изменениями параметров ноцицептивных реакций и паттернами походки крыс.

Заключение

В результате проведенного исследования установлено, что однократное внутривнутрибрюшинное введение интактным крысам PSB-CB5 антагониста мембранных рецепторов GPR18, связанных с G-белком, в дозе 1 мг/кг не вызывало достоверных изменений ПНР, ЛПНР и паттернов походки.

Однократная инъекция одного из FAAs (PEA, SEA или PGlyA) в дозе 1,5 мг/кг крысам после моделирования периферической нейропатии приводила к достоверному снижению выраженности ноцицептивной реакции на механический и термический стимул, оказывая тем самым анальгетическое действие, которое было подтверждено при регистрации паттернов походки: увеличение степени интенсивности и площади отпечатка, а также скорости переноса ипсилатеральной конечности.

У крыс после лигирования седалищного нерва на фоне блокады рецепторов GPR18, PGlyA

оказывал выраженный обезболивающий эффект, что подтверждено достоверными изменениями значений ноцицептивной чувствительности, а также исследуемых параметров походки.

Однако после введения PEA животным с блокадой рецепторов GPR18 достоверные результаты получены лишь при регистрации ЛПНР и площади отпечатка, тогда как после введения SEA статистически значимых данных получено не было.

Таким образом, анализ полученных данных позволяет предположить, что выраженное анальгетическое действие после введения PEA и SEA, возможно, является результатом опосредованного взаимодействия указанных FAAs с орфанными рецепторами. В то же время антиноцицептивный эффект PGlyA, вероятно, возникает вследствие активации иных, а именно неорфанных рецепторов.

Литература

1. Anderson, R. L. N-Fatty acylglycines: under appreciated endocannabinoid-like fatty acid amides? / R. L. Anderson, D. J. Merkler // J. Biol. Nat. 2017. Vol. 8, N 4. P. 156–165.
2. Антиноцицептивный эффект системного введения пальмитоилэтноламида, стеароилэтноламида и диклофенака у крыс с экспериментальным нейрогенным болевым синдромом / А. Ю. Молчанова [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. мед. наук. 2018. Т. 15, № 3. С. 331–338.
3. Ezzili, C. Fatty Acid Amide Signaling Molecule / C. Ezzili, K. Otrubova, D. L. Boger // Bioorg Med. Chem. Lett. 2010 Oct. Vol. 20, N 20. P. 5959–5968.
4. Stensson, N. Altered relationship between anandamide and glutamate in circulation after 30 min of farm cycling: A comparison of chronic pain subject with healthy controls / N. Stensson, A. Grimby-Ekman // Mol. Pain. 2019 Jan-Dec. Vol. 15. 1744806919898360.
5. Use of the CatWalk gait analysis system to assess functional

- recovery in rodent models of peripheral nerve injury – a systematic review / J. Heinzel [et al.] // J. Neurosci Methods. 2020 Nov. Vol. 345. 108889.
6. The influence of rat strain on the development of neuropathic pain and comorbid anxiety-depressive behavior after nerve injury / S. Hestehave [et al.] // Sci. Rep. 2020 Dec. Vol. 10, N 1. 20981.
 7. Чайка, А. В. Методы экспериментального доклинического тестирования анальгетического действия различных факторов на лабораторных крысах и мышях / А. В. Чайка, И. В. Черетаев, Д. Р. Хусаинов // Уч. зап. Крым. федер. ун-та им. В. И. Вернадского. Сер. Биология, химия. 2015. Т. 67, № 1. С. 161–173.
 8. Об утверждении ветеринарно-санитарных правил по приему, уходу и вскрытию подопытных животных в вивариях научно-исследовательских институтов, станциях, лабораториях, учебных заведениях, а также в питомниках : постановление М-ва с.-х. и продовольствия Респ. Беларусь, 21 мая 2010 г., № 36 // Pravo.by [Электронный ресурс] : Нац. правовой Интернет-портал Респ. Беларусь. Режим доступа: <https://pravo.by/document/?guid=3961&p0=W210p0118>. Дата доступа: 17.01.2023.
 9. Evaluating gait and locomotion in rodents with the CatWalk / J. M. Garrick [et al.] // Curr. Protos. 2021 Aug. Vol. 1, N 8. e220.
 10. Gait analysis correlates mechanical hyperalgesia in a model of streptozotocin-induced diabetic neuropathy: A CatWalk dynamic motor function study / W. F. Vieira [et al.] // Neurosci. Lett. 2020 Sep. Vol. 736. 135253.
 11. Оценка антиноцицептивного действия амидов пальмитиновой кислоты / Т. Б. Мелик-Касумов [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. мед. наук. 2016. Т. 15, № 4. С. 25–31.
 12. Nourbakhsha, F. The role of orphan G protein-coupled receptors in the modulation of pain: A review / F. Nourbakhsha, R. Atabakib, A. Roohbakhsh // Life Sci. 2018 Nov. Vol. 212, N 1. P. 59–69.
 13. Computational investigations on the binding mode of ligands for the cannabinoid-activated G protein-coupled receptor GPR18 / A. Neumann [et al.] // Biomolecules. 2020 Apr. Vol. 10, N 5. P. 686.
 14. Molecular and functional interaction between GPR18 and cannabinoid CB2 G protein-coupled receptors. Relevance in neurodegenerative diseases / I. Reyes-Resina [et al.] // Biochem. Pharmacol. 2018 Nov. Vol. 157. P. 169–179.
 15. Молчанова, А. Ю. Эндоканнабиноидная система: физиология, патофизиология, терапевтический потенциал / А. Ю. Молчанова ; под ред. В. С. Улащика ; Нац. акад. наук Беларуси, Ин-т физиологии. Минск : Бел. наука, 2015. 211 с.

Поступила 24.10.2022 г.

Принята в печать 23.02.2023 г.

References

1. Anderson RL, Merkler DJ. N-Fatty acylglycines: under appreciated endocannabinoid-like fatty acid amides? J Biol Nat. 2017;8(4):156-65.
2. Molchanova AYU, Zhavoronok IP, Pekhtereva EI, Antipova OA, Melik-Kasumov TB, Pavlyut TO, i dr. Antinociceptive effect of systemic administration of palmitoylethanolamide, stearoylethanolamide, and diclofenac in rats with experimental neurogenic pain syndrome. Ves Nats Akad Navuk Belarusi Ser Med Navuk. 2018;15(3):331-8. (In Russ.) doi: 10.29235/1814-6023-2018-15-3-331-
3. Ezzili C, Otrubova K, Boger DL. Fatty Acid Amide Signaling Molecule. Bioorg Med Chem Lett. 2010 Oct;20(20):5959-68. doi: 10.1016/j.bmcl.2010.08.048
4. Stensson N, Grimby-Ekman A. Altered relationship between anandamide and glutamate in circulation after 30 min of farm cycling: A comparison of chronic pain subject with healthy controls. Mol Pain. 2019 Jan-Dec;15:1744806919898360. doi: 10.1177/1744806919898360
5. Heinzel J, Längle G, Oberhauser V, Hausner T, Kolbenschlag J, Prahm C, et al. Use of the CatWalk gait analysis system to assess functional recovery in rodent models of peripheral nerve injury – a systematic review. J Neurosci Methods. 2020 Nov;345:108889. doi: 10.1016/j.jneumeth.2020.108889
6. Hestehave S, Abelson KSP, Pedersen TB, Finn DP, Andersson DR, Munro G. The influence of rat strain on the development of neuropathic pain and comorbid anxiety-depressive behavior after nerve injury. Sci Rep. 2020 Dec;10(1):20981. doi: 10.1038/s41598-020-77640-8
7. Chayka AV, Cheretaev IV, Khusainov DR. Methods of experimental preclinical testing of the analgesic effect of various factors on laboratory rats and mice. Uch Zap Krym Feder Un-ta im VI Vernadskogo Ser Biologiya Khimiya. 2015;67(1):161-73. (In Russ.)
8. On approval of veterinary and sanitary rules for the admission, care and autopsy of experimental animals in vivariums of research institutes, stations, laboratories, educational institutions, as well as in nurseries: postanovlenie M-va s.-kh i prodovol'stviya Resp Belarus', 21 maya 2010 g, № 36. V: Nats pravovoi Internet-portal Resp Belarus'. Pravo.by. Available from: <https://pravo.by/document/?guid=3961&p0=W210p0118>. [Accessed 18th January 2023]. (In Russ.)
9. Garrick JM, Costa LG, Cole TB, Marsillach J. Evaluating gait and locomotion in rodents with the CatWalk. Curr Protoc. 2021 Aug;1(8):e220. doi: 10.1002/cpz1.220
10. Vieira WF, Malange KF, de Magalhães SF, Dos Santos GG, de Oliveira ALR, da Cruz-Höfling MA, et al. Gait analysis correlates mechanical hyperalgesia in a model of streptozotocin-induced diabetic neuropathy: A CatWalk dynamic motor function study. Neurosci Lett. 2020 Sep;736:135253. doi: 10.1016/j.neulet.2020.135253
11. Melik-Kasumov TB, Pavlyut TO, Zhavoronok IP, Antipova OA, Pekhtereva EI, Vasilkevich AI, i dr. Evaluation of the antinociceptive action of palmitic acid amides. Ves Nats Akad Navuk Belarusi Ser Med Navuk. 2016;15(4):25-31. (In Russ.)
12. Nourbakhsha F, Atabakib R, Roohbakhsh A. The role of orphan G protein-coupled receptors in the modulation of pain: A review. Life Sci. 2018 Nov;212:59-69. doi: 10.1016/j.lfs.2018.09.028
13. Neumann A, Engel V, Mahardhika AB, Schoeder CT,

- Namasivayam V, Kieć-Kononowicz K, et al. Computational investigations on the binding mode of ligands for the cannabinoid-activated G protein-coupled receptor GPR18. *Biomolecules*. 2020 Apr;10(5):686. doi: 10.3390/biom10050686
14. Reyes-Resina I, Navarro G, Aguinaga D, Canela EI, Schoeder CT, Zaluski M, et al. Molecular and functional interaction between GPR18 and cannabinoid CB2 G protein-coupled receptors. Relevance in neurodegenerative diseases. *Biochem Pharmacol*. 2018 Nov;157:169-179. doi: 10.1016/j.bcp.2018.06.001
15. Molchanova AY; Ulashchik VS, red; Nats akad nauk Belarusi, In-t fiziologii. *Endocannabinoid System: Physiology, Pathophysiology, Therapeutic Potential*. Minsk, RB: Bel navuka; 2015. 211 p. (In Russ.)

Submitted 24.10.2022

Accepted 23.02.2023

Сведения об авторах:

А.С. Доронькина – аспирант, младший научный сотрудник лаборатории модуляции функций организма, Институт физиологии НАН Беларуси,

e-mail: doronkina_nastasya1995@mail.ru – Доронькина Анастасия Сергеевна;

И.П. Жаворонок – к.б.н., зав. лабораторией модуляции функций организма, Институт физиологии НАН Беларуси;

А.Л. Михальчук – к.х.н., ведущий научный сотрудник, и.о. зав. лабораторией химии липидов, Институт биоорганической химии НАН Беларуси;

А.Ю. Молчанова – к.б.н., Институт физиологии НАН Беларуси;

В.Г. Богдан – д.м.н., профессор, академик-секретарь отделения медицинских наук НАН Беларуси.

Information about authors:

A.S. Doronkina – postgraduate, associate research officer of the Laboratory of Modulation of Body Functions, Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus,

E-mail: doronkina_nastasya1995@mail.ru – Anastasiya S. Doronkina;

I.P. Zhavoronok – Candidate of Biological Sciences, head of the Laboratory of Modulation of Body Functions, Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus;

A.L. Mikhal'chuk – Candidate of Chemical Sciences, leading research officer, acting head of the Laboratory of Lipid Chemistry, Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus;

A.Yu. Molchanova – Candidate of Biological Sciences, Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus;

V.G. Bogdan – Doctor of Medical Sciences, professor, Academician-Secretary of the Department of Medical Sciences of the National Academy of Sciences of Belarus.