



Дзюба Д.О.¹, Мельник М.І.^{2,3,4},
Дринь Д.О.^{2,3,4}, Лоскутов О.А.¹,
Жолос О.В.⁴

ПРИГНІЧЕННЯ СКОРОТЛИВОЇ АКТИВНОСТІ ТОНКОГО КИШКІВНИКА ПІСЛЯ ЗАСТОСУВАННЯ АНЕСТЕТИКА КЕТАМІНУ

¹ Національна медична академія післядипломної освіти імені П.Л. Шупика

² Інститут фізіології імені О.О. Богомольця, Національна академія наук України

³ ДУ «Інститут фармакології та токсикології», Національна академія медичних наук України

⁴ ННЦ «Інститут біології та медицини», Київський національний університет імені Тараса Шевченка

Робота виконана в рамках двостороннього договору про наукове співробітництво між НМАПО імені П.Л. Шупика (кафедра анестезіології та інтенсивної терапії) та Інститутом фізіології імені О.О. Богомольця НАН України.

Резюме. Робота присвячена проблемі побічних ефектів загальних анестетиків при проведенні оперативних втручань, що потребують застосування загальної анестезії. Зокрема, одними з поширених ускладнень при використанні анестетиків є порушення моторики кишечника (наприклад, ileus), нудота та блювання. Під час аналізу клінічних даних 60 пацієнтів, яким проводилась анальгоседація (АС) під час стентування коронарних артерій, яких було поділено на 2 групи (1 група – АС Діазепамом та Фентанілом, 2 група АС р-ном Кетаміном, Фентанілом та Пропрофолом), було виявлено суттєво частішу маніфестацію нудоти в періопераційному періоді в групі, де було застосовано Кетамін. Це лягло в основу дослідження молекулярних та клітинних механізмів ефектів кетаміну на скорочувальну активність гладеньких м'язів тонкого кишечника.

Відомо, що анестетики взаємодіють з клітинними рецепторами, G-білками та іонними каналами, включаючи канали транзйентного рецепторного потенціалу (TRP канали). Одні з представників цієї родини, TRPC4 канали, що спряжені з мускариновими рецепторами (M2/M3типу), через активацію G-білків, і які викликають холінергічне збудження та скорочення гладеньких м'язів тонкого кишечника, можуть бути потенційними мішенями дії кетаміну. Тому метою роботи було дослідити ефект кетаміну (100 мкМ) на мускариновий катіонний струм (mICAT), що виникає в гладеньком'язових (ГМ) клітинах тонкого кишечника (ileum) при активації мускаринових рецепторів, та на карбахол-стимульовані скорочення ileum миші. Досліди виконувались на ізольованих клітинах ГМ кишечника за допомогою методу петч-клемп в конфігурації whole-cell. mICAT реєстрували з використанням симетричних Cs⁺-розчинів (125 ммоль/л). Внутрішньоклітинну концентрацію вільного кальцію ([Ca²⁺]_i) фіксували на рівні 100 нмоль/л за допомогою буфера 10 ммоль/л BAPTA/4,6 ммоль/л Ca²⁺. Ізометричні скорочення гладеньких м'язів тонкого кишечника реєструвалися за допомогою методу *invitro* тензометрії. Було показано, що mICAT значно пригнічувався кетаміном в концентрації 100 мкМ. mICAT викликаний карбахоліном (50 мкмоль/л) зменшувався приблизно на 64% (n=5) відносно контролю, а mICAT індукований внутрішньоклітинним ГТФγS (200 мкмоль/л), який активує G-білки безпосередньо (тобто без участі рецепторів), інгібувався приблизно на 42% (n=5). Кетамін пригнічував більше ніж на 40% (n=5) викликані карбахоліном (50 мкмоль/л) скорочення ileum. Отже, кетамін частково впливає як на мускаринові рецептори, але головним чином цей анестетик порушує внутрішньоклітинні ланки передачі сигналів за участі активованих G-білків.

Отримані результати вказують на можливі механізми розвитку післяопераційних порушень моторики кишечника та відкривають нові шляхи для корекції таких станів.

Ключові слова: мускариновий катіонний струм, TRPC4 канали, тонкий кишечник, кетамін, гладенькі м'язи, нудота.

ВСТУП

Першим історично задокументованим успішним застосуванням анестезії є стоматологічне хірургічне втручання під дією діетилового ефіру, проведене Вільямом Томасом Муртоном 16 жовтня 1846 р. [1]. Відтоді анестезіологія значно прогресувала, від застосування досить токсичних ефірів та наркотиків до запровадження широкого ряду новітніх, значно безпечніших і ефективних препаратів. На сьогоднішній день неможливо уявити медицину без застосування анестезії, яку класифікують на місцеву і загальну, що в свою чергу поділяється на внутрішньовенну та інгаляційну.

Серед внутрішньовенних анестетиків протягом останніх 50 років кетамін вважається одним з найбільш широко вживаних та безпечних препаратів. Він був винайдений у 1960-х рр., а перші клінічні випробування зроблені та описані в 1965 р. [2]. Кетамін (СІ-581, 2-О-хлоро-феніл-2-метиламіно-циклогексанон) являється “дисоціативним анестетиком”, що має сильні анагетичні властивості, спричиняє збільшення симпатичної активності та гіпногічну дію [3]. Також, він може бути перспективним засобом проти гострого, післяопераційного та хронічного болю [2, 4, 5]. Крім того, останнім часом його розглядають як потенційний антидепресант [6, 7]. Кетамін являється неопіоїдним анестетиком, тож його застосування є особливо актуальним в часи нинішньої “опіоїдної епідемії”, що має місце в багатьох країнах світу [8].

Хоч головною мішенню кетаміну є збуджувальні NMDA рецептори у нейронах центральної нервової системи, які він пригнічує [9], тим не менш, останнім часом було показано широке різноманіття рецепторів, іонних каналів та інших білкових структур, з якими він взаємодіє, наприклад опіоїдні, нікотинові ацетилхолінові, AMPA та глутаматні рецептори, деякі нейромодулятори та нейростероїди, L-тип Ca_v -каналів, Ca_v -чутливі K^+ канали, тощо [3,10-12]. Така різнобічна дія може призводити як до посилення анестезуючої дії, так і до небажаних побічних ефектів.

Серед різних мішеней побічної дії кетаміну, ми звернули увагу на важливі у нейрональній регуляції різних вегетативних функцій мускаринові ацетилхолінові рецептори (mACh), які, як було показано, пригнічуються цим анестетиком в нейронах та в культурі клітин, що експресувала цей тип рецепторів [13-15]. Окрім нервової системи, mACh рецептори M_2 та M_3 типу широко експресовані також в тонкому кишечнику, зокрема в гладеньких м'язах (ГМ), де вони являються регуляторами перистальтики, активуючись основним збуджувальним нейротрансмітером, що вивільнюється мотонейронами мієнтерального плетива кишечника - ацетилхоліном [16, 17]. Канонічні транзйентні канали ре-

цепторного потенціалу (TRPC) типу 4/6 (TRPC4/6) також експресовані у вісцеральних ГМ та діють у поєднанні з M_2/M_3 mACh рецепторами [18-21] у каскаді сигналів, що лежать в основі АХ-залежної регуляції моторики кишечника.

Транзйентні канали рецепторного потенціалу (TRP) – це велика надродина неселективних катіонних каналів, що проводять іони натрію, кальцію, калію, експресуються практично в усіх типах клітин організму, де відіграють важливі регуляторні фізіологічні функції та модулюються великим різноманіттям чинників, такими як тепло, холод, осмотичний тиск, зміною іонного складу розчину або рН, природними та синтетичними хімічними речовинами тощо [22-24]. TRPC4/6 канали, що є одними з представників TRP з родини канонічних каналів, також експресовані у вісцеральних ГМ та діють у поєднанні з M_2/M_3 mACh рецепторами [18-21]. Незважаючи на значний інтерес наукової спільноти до побічних ефектів анестетиків на нервову систему, питанню їх впливу на шлунково-кишковий тракт (ШКТ) приділяється мало уваги [25, 26]. Паралітичний ілеус – це не тільки суто медична проблема, адже це післяопераційне ускладнення спричиняє значні соціо-економічні негативні наслідки та збитки у сфері охорони здоров'я.

МЕТА РОБОТИ

Пригнічення перистальтики шлунково-кишкового тракту є одним із головних побічних ефектів загальної анестезії, проте механізм її дії власне на гладенькі м'язи тонкого кишечника досі малодосліджені. Таким чином, метою нашої роботи було дослідити, як кетамін впливає на скоротливу активність гладеньких м'язів та на мускариновий катіонний струм, що опосередковує холінергічне збудження в міоцитах тонкого кишечника.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Клінічна частина

Досліджено на базі КЗ КОР «Київська обласна клінічна лікарня» 60 пацієнтів, яким проводилось стентування коронарних артерій з приводу ішемічної хвороби серця. Хворих було поділено на 2 групи, які відрізнялись методом проведення анальгоседації (АС). Пацієнтам 1-ї групи АС проводилась введенням 10 мг р-ну Діазепаму та 100 мкг р-ну Фентанілу на індукцію, та повторним введенням вищезазначених препаратів в тому ж дозуванні для підтримання анестезії протягом оперативного втручання. Для АС пацієнтів 2-ї групи під час проведення оперативного втручання ми використовували р-н Кетаміну у дозуванні 0,25 мг/кг у поєднанні з р-ном Фентанілу – 1,5 мкг/кг на індукцію та 1,5 мг/кг/год для підтримання рівня анальгезії. Для підтримання інтраопераційного рівня седації

III за шкалою RAMSEY (поверхневої седатції) ми використовували р-н Пропофолу у цільовій дозі. Середнє дозування пропофолу на індукцію анестезії склало $0,46 \pm 0,28$ мг/кг, а підтримуюча доза була $0,023 \pm 0,017$ мг/кг/хв.

Антропометричні дані груп дослідження були наступними. У хворих контрольної групи: середній вік $63,2 \pm 11,6$ років, зріст – $1,71 \pm 0,09$ м, вага – $82,7 \pm 12,4$ кг та ІМТ – $28,3 \pm 3,3$ кг/м² (n=30). В дослідній групі ці параметри склали: вік – $60,7 \pm 9,12$, зріст – $1,73 \pm 0,07$ м, вага – $85,7 \pm 15,2$ кг та ІМТ – $28,4 \pm 4,5$ кг/м² (n=30). Фізичний статус в обох групах – II-III клас ASA та ступінь серцевої недостатності був II-III класу за NYHA. Гендерні відмінності в досліджуваних групах були відсутні.

З метою оцінки небажаних ефектів під час періопераційного періоду застосування АС при стентуванні коронарних артерій та комфорту пацієнта ми проводили опитування (з дотриманням принципів інформованої згоди пацієнтів) та нотування скарг. Матеріали оброблено програмою статистичного аналізу «Statistica».

Експериментальні тварини

В експериментах використано мишей-самців (вік 3 міс.) лінії BALB/c вагою 30-35 г. Тварин утримували за стандартних умов віварію Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України. Всю експериментальну роботу проводили відповідно до конвенції Ради Європи щодо захисту хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986), виконано у відповідності до Хельсінської декларації (Всесвітня медична асамблея, 1964), Декларації принципів толерантності (28 сесія ЮНЕСКО, 1995), Універсальної декларації по біоетиці та правах людини (ООН, 1997), норм Конвенції про захист прав людини у зв'язку з впровадженням нових біомедичних технологій, прийнятою у 1997 році у м. Ов'єдо (Іспанія) та прийнятого Верховною Радою України у 2002 році Закону України № 3447 IV «Про захист тварин від жорстокого поводження».

Виділення ізольованих клітин гладеньких м'язів тонкого кишечника

Експерименти проводили на ізольованих клітинах тонкого кишечника миші. Тварини були піддані етаназії шляхом асфіксії з використанням CO₂. Черевну порожнину розтинали, виділяли саме повздожні гладенькі м'язи тонкого кишечника та поміщали у модифікований розчин Кребса (ммоль/л: 120 NaCl, 12 глюкоза, 10 HEPES, 6 KCl, 2,5 CaCl₂, 1,2 MgCl₂, рН 7.4 (NaOH)). Гладеньком'язові смужки нарізали на фрагменти довжиною 1 мм і поміщали у безкальцієвий та безмагнієвий розчин Кребса (ммоль/л: 120 NaCl, 12 глюкоза, 10 HEPES, 6 KCl, рН 7.4 (NaOH)). Фер-

ментативна інкубація клітин відбувалася у тому ж розчині з додаванням колагенази типу 1А (1 мг/мл), інгібітора трипсину (1 мг/мл) та бичачого альбуміну (1 мг/мл) упродовж 17 хв за температури 36 °С. Далі препарат відмивали тричі у безкальцієвому розчині Кребса і механічно розмішували піпеткою Пастера. До отриманої клітинної суспензії додавали звичайний розчин Кребса у пропорції 1:2. Суспензію розливали на покривні скельця і використовували в експериментах упродовж 8 год.

Реєстрація скоротливої активності гладеньких м'язів кишечника

Для реєстрації скоротливої активності гладеньких м'язів кишечника черевну порожнину розтинали, поздовжні гладенькі м'язи клубової кишки швидко витягували і поміщали в модифікований розчин Кребса, що містить (в ммоль/л) 120 NaCl, 6 KCl, 2,5 CaCl₂, 1,2 MgCl₂, 12 глюкоза, 10 HEPES, рН доводили до 7,4 за допомогою NaOH). Ділянки клубової кишки нарізалися сегментами (довжиною 1 см), які були виділені, як описано вище, і поміщені в 25-мл ванночки, наповнені розчином Кребса-Рінгера (склад в ммоль/л: 120 NaCl, 6 KCl, 1,2 MgCl₂, 1,35 NaH₂PO₄, 14,4 NaHCO₃, 2,5 CaCl₂, 11,5 глюкоза) в газових камерах з сумішшю 5% CO₂ - 95% O₂ при 37°C. Після 30 хв періоду релаксації м'язів у розчині, ізометричні скорочення реєстрували за допомогою зовнішнього датчика переміщення сили (World Precision Instruments, Сарасота, Флорида, США), підключеного до системи збору даних PowerLab (ADInstruments, Колорадо-Спрінгс, Колорадо, США).

Реєстрація трансмембранних струмів

Трансмембранні струми реєстрували методом «петч-клемп» у конфігурації whole-cell з використанням підсилювача AxoPatch 200B та програмного забезпечення pClamp 8 (Molecular Devices, Саннвейл, Каліфорнія, США) при кімнатній температурі (22–24 °С). Петч піпетки отримували з боросилікатного скла (зовнішній діаметр 1,5 мм, а внутрішній – 0,86 мм; Sutter Instruments, Новато, Каліфорнія, США) за допомогою мікроелектродної витяжки P-97 (Sutter Instruments, Новато, США) Після їх заповнення внутрішньопіпеточним розчином вони мали опір 3–5 МОм. Перед початком експерименту ізольовані клітини помістили в модифікований розчин Кребсу-HEPES, склад якого детально описано вище.

Для реєстрації трансмембранних струмів використовували цезієвий зовнішній розчин такого складу (в ммоль/л): CsCl 120, глюкоза 12, HEPES 10, рН 7.4 (CsOH). Для ізоляції мКАТ концентрацію внутрішньоклітинного кальцію фіксували на рівні близько 100 нмоль/л з використанням вну-

трішньопіпеточного розчину наступного складу (в ммоль/л): CsCl 80, MgATP 1, креатин 5, глюкоза 5, ВАРТА 10, НЕРЕС 10, CaCl₂ 4.6, рН 7.4 (CsOH). Для безпосередньої активації G-білка з метою отримання катіонного струму через TRPC4/6 у внутрішньоклітинний розчин додавали 200 мкмоль/л гуанозинтрифосфату-γS (ГТФγS) (який активує G-білки безпосередньо, тобто минаючи мускаринові рецептори) або, коли викликали карбахол-індуковані (50 мкмоль/л) мКАТ через активацію мускаринових M2 і M3 рецепторів, до внутрішньоклітинного розчину додавали 1 ммоль/л ГТФ, щоб уникнути десенситизації струму (Zholos і Bolton, 1996). Після утворення щільного контакту між мембраною клітини і піпеткою, послідовний опір компенсувалося на ~ 30%. Підтримуючий потенціал був -40 мВ. Стационарну вольт-амперну (I-V) залежність було виміряно за допомогою «clamp» протоколу поступового зміщення потенціалу від 80 мВ до -120 мВ тривалістю 6 с, які були застосовані кожні 30 с. Кінетику потенціалозалежної деактивації мКАТ оцінювали шляхом використання ступінчастих потенціалів від -40 до -120 мВ протягом 1,2 с до «clamp». Мембранні струми були відфільтровані з частотою зріза 2 кГц і відцифровані з частотою 10 кГц.

Статистична обробка результатів

Аналіз результатів та побудову графіків проводили з використанням програмного забезпечення pClamp 9.2 (Axon Instruments, Inc.), Clampfit 9 (Molecular Devices) і Origin 9.5 2018 (OriginLab Corporation, Northampton, Массачусетс, США). Усі експериментальні результати наведено у вигляді середньої арифметичної (M) та її стандартної похибки (m) для певної вибірки (n). n відображає кількість «запетчованих» клітин у досліді. t-критерій Стьюдента використовували для статистичного порівняння і відмінності були прийняті статистично достовірними зі значенням P менше 0,05.

РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ

Кетамін є відомим внутрішньовенним анестетиком, що знайшов широке застосування в анестезіології та медицині болю. Він має декілька переваг: відсутність кардіодепресивного ефекту, збереження ларингіальних рефлексів та підтримання спонтанної вентиляції, що особливо важливо при оперативних втручаннях зі збереженням спонтанним диханням. Зазвичай цей препарат використовується у якості основного анестетика та викликає «диссоціативну» анестезію, яку пов'язують з великою частотою галюцинацій, ажитації у післяопераційному періоді. Однак, останнім часом збільшуються покази застосування субнаркоотичних доз (0,2-0,75 мг/кг), які викликають достатню аналгезію та опіат-збері-

гаючі властивості без особливих психотичних ефектів із суттєвою седацією [26,27].

В інтервенційній радіології цей препарат теж знайшов широке застосування. Є ряд робіт, в яких описано досвід використання розчину кетаміну в комбінаціях з пропофолом чи дексмедетомідином для аналгоседації під час роботи в радіологічній операційній та проведення втручань кардіологічного профілю. При здійсненні цих маніпуляцій основною задачею лікаря анестезіолога є забезпечення глибокої седації, що є особливістю педіатричної практики. Так, використання вищезазначених комбінацій було достатньо безпечним без значних кардіодепресивних та респіраторних ефектів [29,30].

Кетамін взаємодіє з безліччю інших клітинних мембранних структур, зокрема з рецепторами та іонними каналами, такими як нікотинові рецептори ацетилхоліну, AMPA, mGlu рецептори, потенціалозалежні Na⁺ та L-тип Ca²⁺ канали серед багатьох інших. Відповідно, кетамін викликає різноманітні побічні ефекти, хоча деякі з цих інших фармакологічних ефектів (тобто додаткові до блокади рецепторів NMDA) можуть насправді позитивно сприяти його анестезуючій та знеболювальній дії. Крім краще вивчених психіатричних та неврологічних побічних ефектів, також спостерігаються часті серцево-судинні ускладнення, такі як зниження артеріального тиску та частоти серцевих скорочень, серцебиття, біль у грудях, порушення сечовиділення, нудота, блювання та інші симптоми, такі як помутніння зору [11].

В післяопераційному періоді основною скаргою в контрольній групі була сонливість, яка спостерігалась у 11 пацієнтів. Слід зазначити, що залишкову сонливість відмічали і 5 пацієнтів на відмітці 3 години після оперативного втручання. Щодо групи, в якій застосовувався р-н кетаміну та пропофолу, після операції подібні скарги мав лише 1 хворий та жоден через 3 години після оперативного втручання. Цей феномен ми пов'язуємо з довгим періодом напіввиведення р-ну діазепаму.

В групі, де застосовувався р-н кетаміну, на перший план на етапі індукції вийшли такі скарги як запаморочення та нудота. А саме нудота є основним з побічних ефектів під час медикаментозної седації. Вона виявляється в 21% випадків, такі дані були отримані при аналізі 753 аналгоседацій під час ендоскопій [31]. Так помірне запаморочення відмічали 14 (46,6%) пацієнтів (n=30). Це відчуття не викликало суттєвого дискомфорту, але 10 (33,3%) з них разом з цим відчували помірну нудоту. Так, використання опіатів під час анестезії пов'язано з високою вірогідністю нудоти та блювання, а при застосуванні р-ну кетаміну є навіть термін «кетамін-асоційоване блювання» [28]. Але в кон-

трольній групі запаморочення відчували 7 пацієнтів, при чому нудотою це явище супроводжувалося у 4 пацієнтів. Тому в 3-ій групі ми це пов'язали з застосуванням кетаміну.

Для лікування нудоти та блювання обґрунтованим методом є застосування ондасетрону [28, 32,33]. Після виникнення епізодів нудоти ми внутрішньовенно вводили пацієнтам 4 мг р-ну ондасетрону. У 8 хворих 2-ї групи нудота зникла через $4,5 \pm 1,6$ хв., а у 3-х пацієнтів контрольної групи – через $5,3 \pm 1,5$ хв. 2 хворим 2-ї групи та 1 – першої через 5 хвилин було повторно введено 4 мг ондасетрону. Явища нудоти після цього зменшились в 2-ї групі через $9,5 \pm 1,2$ хв, а у одного пацієнта контрольної групи, який потребував повторного введення – через 8 хвилин. Слід зауважити, що цей факт вплинув і на тривалість підготовчого періоду до оперативного втручання.

В післяопераційному періоді явища нудоти протягом перших 3-х годин спостерігалися у 7 пацієнтів та, в більш пізній період, першої після операційної доби ще у 3 хворих 2-ї групи. Після введення 4 мг ондасетрону ці явища зникали та не потребували повторного введення. В контрольній групі на відмітці до 3-х годин – у 3-х пацієнтів, а протягом перших 24-х годин у 2-х пацієнтів терапія ондасетроном теж виявилася ефективною.

Слід зауважити, що серед усіх випадків нудоти не було жодного епізоду блювання. Загальну кіль-

кість епізодів нудоти зображено на рис 1. Збільшена кількість епізодів нудоти спонукала нас розпочати подальші дослідження цього феномену на більш глибокому рівні.

Так, окрім описаних вище клінічних проявів післяопераційних розладів у пацієнтів, також існує значна проблема порушень нормального функціонування шлунково-кишкового тракту, зокрема паралітичний ілеус, який може виникати внаслідок хірургічного втручання в абдомінальну порожнину, але також і при будь-яких інших операціях, і проявляється сповільненням або припиненням просування вмісту кишкового тракту. Однією з причин його розвитку можуть виступати анестетики, що висвітлювалось в літературі [25, 26], зокрема, кетамін [34-37]. Тим не менш механізм виникнення пригнічення перистальтики кишечника внаслідок дії загальної анестезії досі залишається невідомим.

Наші попередні результати стосовно іншого анестетику [38] демонструють значне інгібування інгаляційним загальним анестетиком ізофлураном в концентрації 0,5 ммоль/л (клінічна концентрація) mICAT в гладеньком'язових клітинах (ГМК) кишечника (ілеум). Ізофлуран пригнічував на майже 30% викликані карбахоліном (50 мкмоль/л) скорочення ілеум і colon миші. mICAT викликаний карбахоліном (50 мкмоль/л) ізофлуран блокував на 63 ± 11 % (n=5) відносно контролю, а mICAT

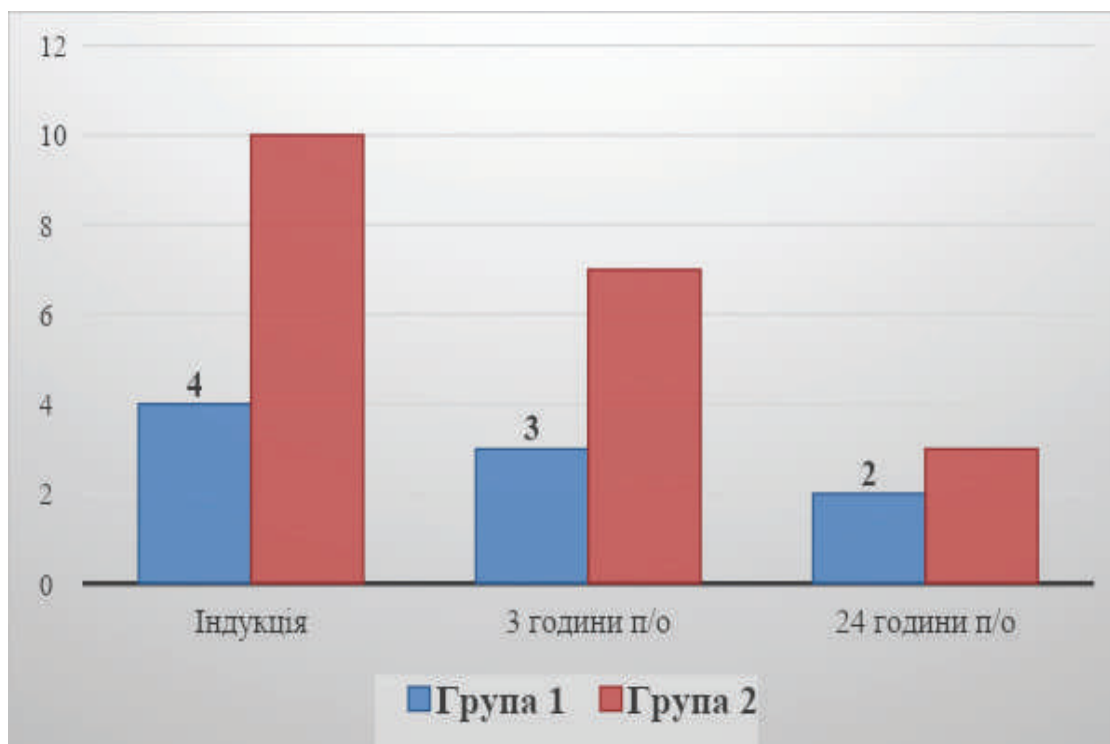


Рис. 1. Кількість епізодів нудоти в періопераційному періоді стентування коронарних артерій.

викликаний внутрішньоклітинним ГТФγS (200 мкмоль/л) блокував на $44 \pm 9\%$ ($n=6$). Варто зазначити, що ізофлуран також впливав як на мускаринові рецептори, так і на внутрішньоклітинну передачу сигналів за участі активованих G-білків.

Враховуючи вищезазначене, одним із завдань роботи було дослідити вплив кетаміну на скорочення ileum тонкого кишечника миші *in vitro* методом тензометрії в ізометричному режимі вимірювання. Як ініціатор скоротливої відповіді використовували карбахол – стабільний аналог ацетилхоліну, що в свою чергу виступає основним нейрогенним стимулятором процесу скорочення гладеньких м'язів у тонкому кишечнику.

На рисунку 2 показано результат типового експерименту, і видно, що карбахол (50 мкМ) викликав пікове фазне скорочення за яким слідувало тоничне плато з осциляціями. Після контрольного тесту на карбахол, препарат не менше 30-40 хвилин відмивали у розчині Кребсу. Потім, в омиваючий розчин додавали кетамін в концентрації 100 мкМ [39], після 20-хвилинної інкубації препарату в анестетику знову аплікували карбахол і порівнювали відповідь. Так, кетамін пригнічував скоротливу відповідь повздожніх гладеньких м'язів ileum на карбахол і амплітуда фазних скорочень становила $58,1 \pm 6,4\%$ ($n = 5$, Рис. 2А), тобто зменшення приблизно на 40% порівняно з контролем.

Також, кетамін виражено пригнічував спонтанні скорочення тонкого кишківника, що вид-

но на Рис. 2Б на фрагментах реєстрації до подачі карбахолу (вставки). Отримані дані надають експериментального підтвердження клінічним проявам післяопераційних розладів функціонування шлунково-кишкового тракту в пацієнтів і виявляють важливу ланку, чутливу до дії анестетиків – гладенький м'яз, а зокрема ацетилхоліновий шлях активації його скорочення. Мускаринові ацетилхолінові рецептори M2 та M3 типу широко експресовані в гладеньких м'язах тонкого кишківника та регулюють скорочення кишкового тракту внаслідок нейрогенної стимуляції ацетилхоліном [16,17]. Після активації mACh рецепторів, через Gq/11 та Gi/o білки активуються катіонні TRPC4 канали, які таким чином генерують так званий мускариновий катіонний струм (mICAT), що є фізіологічно важливим для забезпечення скоротливої активності кишечника [18-21], і, відповідно, може бути мішенню пригнічуючої дії анестетиків. Отже, наступним завданням було дослідити ефект кетаміну на mICAT, що переважно (на 85%) протікає через TRPC4-канали гладеньком'язових клітин ileum миші.

У даному дослідженні були використані різні шляхи активації TRPC4- каналів з метою з'ясування механізму, який може бути залучений в розвиток інгібуючої дії анестетику на mICAT. Карбахол – це стабільний аналог ацетилхоліну, основного нейротрансмітера парасимпатичної нервової системи, який зв'язується з мускариновими рецепторами на зовнішній стороні мембрани та через

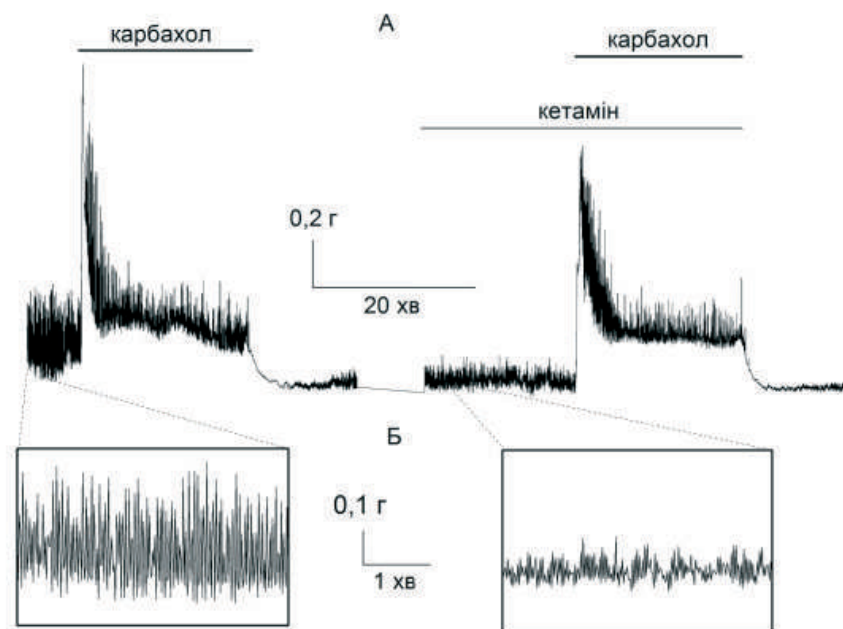


Рис. 2. Вплив кетаміну на спонтанну на карбахол-індуковану скоротливу активність повздожніх гладеньких м'язів тонкого кишківника миші.

Примітки: А – зменшення скоротливої відповіді на карбахол при дії кетаміну; Б – пригнічення спонтанної активності кишківника під впливом кетаміна. Ілюстрації на даному рисунку - результат типового експерименту на одному гладеньком'язовому препараті ($n=5$).

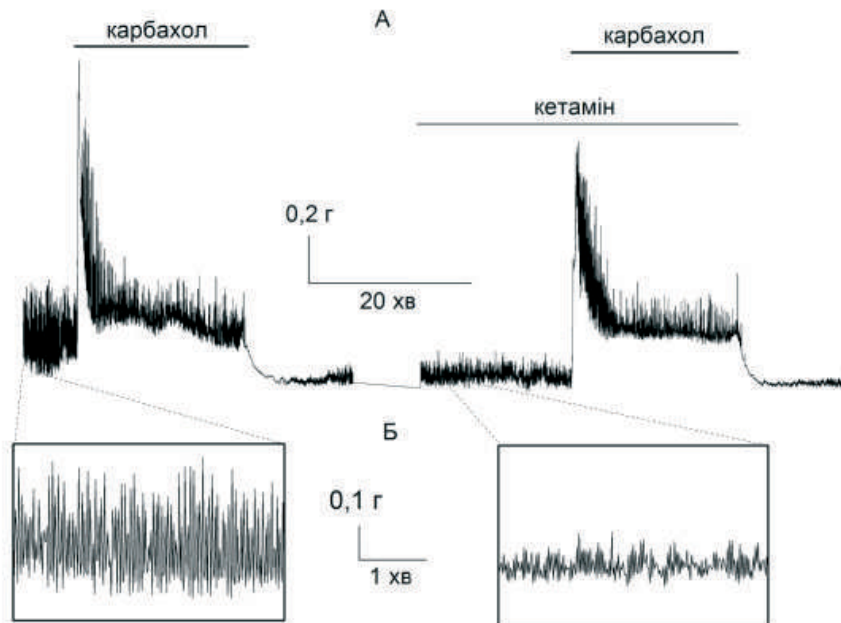


Рис. 3. Кетамін (100 мкМ) пригнічує карбахол-індукований мускариновий катіонний струм в гладеньком'язових клітинах тонкого кишківника миші.

Примітки: А – "пилкоподібний" 6-секундний протокол реєстрації катіонного струму; Б – типовий mICAT у відповідь на додавання карбахолу (50 мкМ) та його пригнічення кетаміном (максимальне блокування - чорна лінія); В – розвиток інгібуючої дії кетаміну з часом та при різних фіксуючих потенціалах (80, -40 та -120 мВ, відповідно); Г – вольт-амперна характеристика максимального струму у відповідь на карбахол (50 мкМ, сіра лінія) та максимально пригніченого струму після дії кетаміну (чорна лінія). Усі ілюстрації на даному рисунку - результат типового експерименту на одній клітині.

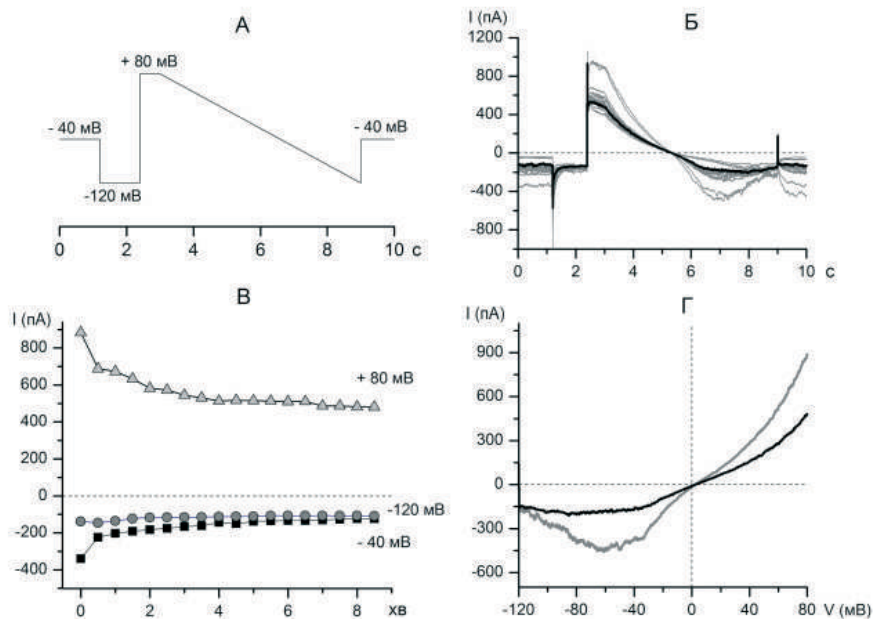


Рис. 4. GTP γ S-індукований мускариновий катіонний струм пригнічується додаванням кетаміну (100 мкМ) в гладеньком'язових клітинах ілеум миші.

Примітки: А – типовий mICAT у відповідь на додавання GTP γ S (200 мкМ) та його пригнічення кетаміном (максимальне блокування – чорна лінія); Б – розвиток інгібуючої дії кетаміну з часом та при різних фіксуючих потенціалах (80, -40 та -120 мВ, відповідно); В – вольт-амперна характеристика максимального струму у відповідь на GTP γ S (200 мкМ, сіра лінія) та максимально пригніченого струму після дії кетаміну (чорна лінія); Г – порівняння інтенсивності інгібуння струму індукованого карбахолом (2) або GTP γ S (3), у відсотках, по відношенню до відповідних контрольних значень (1). Ілюстрації А-В на даному рисунку – результат типового експерименту на одній клітині, Г – статистичні дані mean \pm SEM (n = 5, * – P \leq 0,05 по відношенню до контрольних значень).

складний G-білковий сигнальний шлях регулює активність TRPC4 каналів. Для мінімізації десенситизації рецепторів під час досліду у внутрішньоклітинний розчин додавали 1 мМ ГТФ. Амплітуди карбахол-індукованих струмів вимірювалися при різних фіксованих потенціалах, -40, -120, 80 мВ, відповідно, із застосуванням складного “пилкоподібного” 6-секундного протоколу реєстрацій зі зміною фіксованого потенціалу від 80 до -120 мВ та з комбінацією “ступінчатих” протоколів -120, 80 та -40 мВ (Рис. 3А). Вольт-амперні характеристики в стаціонарному стані, що реєструвалися кожні 30 с, мали характер струму подвійного випрямлення біля значення потенціалу реверсії (приблизно 0 мВ) та були U-подібної форми при негативних потенціалах, що є унікальними біофізичними характеристиками mICAT (Рис. 3).

Додавання кетаміну в концентрації 100 мкМ достовірно пригнічувало з часом катіонний струм, викликаний попередньою аплікацією 50 мкМ карбахолу (Рис. 3Б, В). Важливо відмітити, що інгібування розвивалось досить повільно, а кетамін практично не відмивався. Карбахол-ініційований mICAT мав середню максимальну амплітуду струму $-532,9 \pm 110,1$ пА при -40 мВ ($n = 5$). Кетамін сильно пригнічував mICAT до середніх значень $-194,8 \pm 26,9$ пА ($P < 0,05$; $n = 5$, Рис. 3Г).

Одними з небагатьох фармакологічних засобів для стимуляції моторики ШКТ при ileus є інгібітори ацетилхолінерастери (фізостигмін, галантамін, прозерин та ін.). Така стратегія базується на ідеї, що концентрація ацетилхоліну у синаптичних щілинах має підвищуватись, якщо блокувати його гідроліз. Однак ці препарати є не тільки малоефективними, але і небезпечними (варто нагадати, що аналогічну дію має зарин - бойова отруйна речовина нервово-паралітичної дії). Дані на Рис. 2 та 3 демонструють, чому підвищення концентрації агоніста мускаринових рецепторів може бути не ефективним підходом до лікування ileus, адже карбахол-індукований струм значно пригнічується кетаміном навіть у присутності принаймні у 50 разів вищої за фізіологічну концентрації стабільного (тобто негідролізованого) аналогу ацетилхоліну – карбахоліну. Дійсно, за різними оцінками за фізіологічних умов концентрація ацетилхоліну, що активує скоротливу активність ГМ ШКТ, не перевищує 1 мкМ/л. З іншого боку, як і у випадку ізофлурану [38], основною молекулярною мішенню для дії кетаміну могли би бути не власне мускаринові рецептори, а інші сигнальні каскади, що беруть участь у процесах холінергічного збудження і скорочення вісцеральних ГМ [16].

Одним з таких найбільш важливих інших шляхів активації TRPC4 рецептор-керованих катіонних каналів є активація Gq/11 та Gi/o білків,

які з'єднані сигнальним каскадом з цими каналами. Для з'ясування питання чи кетамін блокує мускариновий струм за умов, коли мускаринові рецептори не беруть участі в його активації, ми провели серію експериментів з інфузією GTPγS (200 мкМ), прямого активатора тримерних G-білків, через петч-піпетку прямо всередину ізольованого міоциту, що повільно ініціювало розвиток mICAT впродовж 5-10 хвилин. Рисунок 4 демонструє типовий приклад GTPγS-викликаного струму ізольованої гладеньком'язової клітини ileum, зареєстрованого з використанням 6-секундного “пилкоподібного” протоколу. В середньому максимальний струм при 40 мВ за таких умов становив $347,3 \pm 22,3$ пА ($n=5$) в контролі та зменшувався до значення $-203,4 \pm 35,8$ пА ($n=5$) після дії кетаміну. Зміна амплітуди струму з часом зазвичай реєструється при трьох вище зазначених потенціалах фіксації.

mICAT ініційовані карбахолом порівнювали зі струмами, викликаними GTPγS. GTPγS взаємодіяв напряму з G-білками оминаючи мускаринові ацетилхолінові рецептори та, таким чином, зменшуючи десенситизацію. Нормалізований на ємність клітини максимальний струм (тобто щільність струму, що не залежить від розміру клітини) при фіксованому потенціалі -40 мВ у відповідь на карбахол складав $-14,8 \pm 4,1$ пА/пФ, тоді як при максимальному інгібуванні струм був $-5,4 \pm 1,2$ пА/пФ, отже кетамін пригнічував мускариновий струм на $64,1 \pm 2,4\%$ ($n = 5$, Рис. 4Г - (2)). Аналогічна концентрація кетаміну схожим чином пригнічувала і викликані GTPγS mICAT від значення $-347,3 \pm 22,3$ пА в контролі до значення $-203,4 \pm 35,8$ пА після дії кетаміну; відповідна щільність струму була $-13,8 \pm 1,9$ пА/пФ і $-7,4 \pm 1,8$ пА/пФ, відповідно, таким чином пригнічення було на $45,4 \pm 9,9\%$ ($n = 4$, Рис. 4Г -(3)). Важливо зазначити, що максимальне пригнічення кетаміном струму, викликаного GTPγS наступало приблизно через 4 хвилини від аплікації, тоді як струму, викликаного карбахолом - через 3 хвилини. Така кінетика інгібування mICAT є значно швидшою за звичайний процес десенситизації, але при цьому достатньо повільна, щоб вказувати на пряме блокування катіонного каналу.

Слід зазначити, що ступінь інгібування кетаміном індукованих карбахолом та GTPγS струмів у той самій концентрації була досить подібною: ці відміни були на межі статистичної достовірності з $P=0,046$. Отже, наш порівняльний аналіз засвідчує негативний ефект цього анестетика на мускариновий катіонний струм, а отже і на процеси холінергічного збудження і скорочення вісцеральних ГМ. Хоча мускаринові рецептори і дещо пригнічуються кетаміном, цей ефект пов'язаний, головним чином,

із блокуванням функції G-білків та, ймовірно, регульованих ними чисельних каскадів внутрішньоклітинного сигналіну (активність фосфоліпази C, аденеліциклази, вивільнення Ca²⁺ з внутрішньоклітинних депо та ін.). З'ясування питання яких саме, очевидно, потребує подальших досліджень, але на цьому етапі вже стає зрозумілішим, чому інгібітори ацетилхолінерастери не є надто ефективними препаратами для посилення моторики ШКТ у післяопераційний період.

ВИСНОВКИ

1. Під час клінічних досліджень нами виявлено, що застосування р-ну кетаміну під час стентування коронарних артерій пов'язано зі збільшеною кількістю епізодів нудоти в періопераційному періоді.

2. Було показано вплив внутрішньовенного анестетику кетаміну на мускариновий катіонний стру (mICAT) в міоцитах тонкого кишечника (ileum) та на карбахол-стимульовані скорочення ileum миші. Отримані результати передбачають, що основними мішенями кетаміну є частково мускаринові рецептори та, головним чином, G-білки, в той час як будь-яке пряме інгібування катіонних TRPC4-каналів є менш ймовірним та потребує окремих досліджень.

3. Отримані результати та подальші дослідження у цьому напрямку дозволять ідентифікувати сигнальні ланки, які ведуть до порушення моторики кишечника внаслідок застосування загального наркозу, як одного з поширених післяопераційних ускладнень.

Конфлікт інтересів: відсутній.

Conflicts of interest: authors have no conflict of interest to declare.

Надійшла до редакції / Received: 17.01.2020

Після доопрацювання / Revised: 28.01.2020

Прийнято до друку / Accepted: 26.05.2020

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Robinson DH, Toledo AH. Historical development of modern anesthesia. *J Invest Surg.* 2012 Jun; 25(3):141-9.
- Niesters M, Martini C, Dahan A. Ketamine for chronic pain: risks and benefits. *Br J Clin Pharmacol.* 2013. 77:2. 357-367.
- Sleigh J, Harvey M, Voss L, Denny B. Ketamine: More mechanisms of action than just NMDA blockade. *Trends in Anaesthesia and Critical Care.* 2014. 4:76-81.
- Cheryl AA, Ivester JR Jr. Low-Dose Ketamine for Postoperative Pain Management. *Journal of PeriAnesthesia Nursing.* 2018. 33(4): 389-398.
- Remerand F, Le Tendre C, Baud A, Couvret C, Pourrat X, Favard L, et al. The early and delayed analgesic effects of ketamine after total hip arthroplasty: a prospective, randomized, controlled, double-blind study. *Anesth Analg.* 2009. 109(6):1963-1971.
- Iadarola ND, Niciu MJ, Richards EM, Vande Voort JL, Ballard ED, et al. Ketamine and other N-methyl-D-aspartate receptor antagonists in the treatment of depression: a perspective review. *Ther Adv Chronic Dis.* 2015. 6(3): 97-114.
- Cusin C. Ketamine as a Rapid Antidepressant. *The Massachusetts General Hospital Guide to Depression.* Humana Press, Cham, 2019. 139-145.
- Doan LV, Jing W. An Update on the Basic and Clinical Science of Ketamine Analgesia. *The Clinical Journal of Pain.* 2018. 34(11): 1077-1088.
- MacDonald JF, Miljkovic Z, Pennefather P. Use-dependent block of excitatory amino acid currents in cultured neurons by ketamine. *J Neurophysiol.* 1987. 58(2):251-266.
- Irnaten M, Wang J, Venkatesan P, Evans C, Chang K, Andresen M, Mendelowitz D. Ketamine Inhibits Presynaptic and Postsynaptic Nicotinic Excitation of Identified Cardiac Parasympathetic Neurons in Nucleus Ambiguus. *Anesthesiology.* 2002. 96:667-674.
- Zanos P, Moaddel R, Morris PJ, Georgiou P, Fischell J, et al. NMDAR inhibition-independent antidepressant actions of ketamine metabolites. *May 2016. NATURE.* 533: 481-486.
- Hatakeyama N, Yamazaki M, Shibuya N, Yamamura S, Momose Y. Effects of ketamine on voltage-dependent calcium currents and membrane potentials in single bullfrog atrial cells. *J Anesth.* 2001. 15(3):149-153.
- Durieux ME. Inhibition by ketamine of muscarinic acetylcholine receptor function. *Anesth Analg.* 1995 Jul. 81(1):57-62.
- Hirota K, Hashimoto Y, Lambert DG. Interaction of intravenous anesthetics with recombinant human M1-M3 muscarinic receptors expressed in chinese hamster ovary cells. *Anesth Analg.* 2002 Dec. 95(6):1607-1610.
- Morita T, Hitomi S, Saito S, Fujita T, Uchihashi Y, Kuribara H. Repeated ketamine administration produces up-regulation of muscarinic acetylcholine receptors in the forebrain, and reduces behavioral sensitivity to scopolamine in mice. *Psychopharmacology.* 1995. 117: 396.
- Bolton TB, Prestwich SA, Zholos AV, Gordienko DV. Excitation-contraction coupling in gastrointestinal and other smooth muscles. *Annu. Rev. Physiol.* 1999. 61: 85-115.
- Zholos AV. Regulation of TRP-like muscarinic cation current in gastrointestinal smooth muscle with special reference to PLC/InsP3/Ca²⁺ system. *Acta Pharmacol.* 2006. 27: 833-842.
- Tsvilovsky VV, Zholos AV, Aberle T, Philipp SE, Dietrich A, Zhu MX, Birnbaumer L, Freichel M, Flockerzi V. Deletion of TRPC4 and TRPC6 in mice impairs smooth muscle contraction and intestinal motility in vivo. *Gastroenterol.* 2009. 137: 1415-1424.
- Zholos AV, Bolton TB. Muscarinic receptor subtypes controlling the cationic current in guinea-pig ileal smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* 1997. 122: 885-893.
- Gordienko DV, Zholos AV. Regulation of muscarinic cationic current in myocytes from guinea-pig ileum by intracellular Ca²⁺ release: a central role of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Cell Calcium.* 2004. 36: 367-386.
- Jeon JP, Hong C, Park EJ, Jeon JH, Cho NH, Kim IG, Choe H, Muallem S, Kim HJ, So I. Selective Gai subunits as novel direct activators of transient receptor potential canonical (TRPC)4 and TRPC5 channels. *J. Biol. Chem.* 2012. 287: 17029-17039.
- Clapham DE. TRP channels as cellular sensors. *Nature.* 2003. 426:517-524.
- Nilius B, Owsianik G. The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biol.* 2011. 12(3):218-229.
- Voets T, Talavera K, Owsianik G, Nilius B. Sensing with TRP channels. *Nature Biol Chem.* 2005. 1:85-92.
- Ogilvy AJ, Smith G. The gastrointestinal tract after anaesthesia. *Eur. J. Anaesthesiol.* 1995. 10: 35-42.
- Resnick J, Greenwald DA, Brandt LJ. Delayed gastric emptying and postoperative ileus after nongastric abdominal surgery: part I. *Am J Gastroenterol.* 1997. 92: 751-762.
- Wiriyana M, Sinaraja K, Budiarta G, Gde T, Senapathi A, et al.. Low dose ketamin. *Bali Journal of Anesthesiology.* 2017. 1: 13-19.
- Sheikh S, Hendry P. The Expanding Role of Ketamine in the Emergency Department. *Drugs.* 2018. 78(7): 727-735.
- Sree S, Somita C, Thota VS. A Clinical Study of Comparison of Dexmedetomidine and Ketamine Versus Propofol and Ketamine for Procedural Sedation in Children Undergoing Device Closure. *Clinical Medicine.* 2019. 7(2): 37-42.
- Joshi, Sagar V, Kollu SS, Sharma RM. Comparison of dexmedetomidine and ketamine versus propofol and ketamine for procedural sedation in children undergoing minor cardiac procedures in cardiac catheterization laboratory. *Annals of cardiac anaesthesia.* 2017. 20(4): 422.
- Lee J K. Adverse events associated with drugs used for endoscopic sedation: a nationwide assessment. *Endoscopy.* 2019. 51(4): 192.
- Gupta RK, Makkar R, Lamba PS. Comparison of effectiveness of intravenous palonosetron versus ondansetron in prevention of postoperative nausea and vomiting in laparoscopic surgeries under general anaesthesia: a randomised double blind interventional study. *International Journal of Scientific Research.* 2020. 9(1): 72-74.
- Yazbeck-Karam VG, Siddik-Sayyid SM, Barakat HB, Korjian S, Aouad MT. Haloperidol versus ondansetron for treatment of established nausea and vomiting following general anaesthesia: a randomized clinical trial. *Anesthesia & Analgesia.* 2017. 124(2): 438-444.
- Amoroso P, Best CJ. Paralytic ileus during ketamine infusion. *Anaesthesia* 1989. 44: 74.

35. Elfenbein JR, Robertson SA, Corser AA, Urion RJ, Sanchez LC. Systemic effects of a prolonged continuous infusion of ketamine in healthy horses. *J Vet Intern Med.* 2011. 25: 1134-1137.
36. Schnoor J, Unger JK, Kochs B, Silny J, Rossaint R. Effects of a single dose of ketamine on duodenal motility activity in pigs. *Can Vet J.* 2005. 46: 147-152.
37. Ye F, Wu Y, Zhou C. Effect of intravenous ketamine for postoperative analgesia in patients undergoing laparoscopic cholecystectomy: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* 2017. 96: 9147.
28. Dryn D, Luo J, Melnyk M, Zholos A, Hu H. Inhalation anaesthetic isoflurane inhibits the muscarinic cation current and carbachol-induced gastrointestinal smooth muscle contractions. *European Journal of Pharmacology.* 2018. 820: 39-44.
39. Baker SC, Shabir S, Georgopoulos NT, Southgate J. Ketamine-Induced Apoptosis in Normal Human Urothelial Cells. *The American Journal of Pathology.* 2016. 186(5): 1267-1277.

DZIUBA D., MELNYK M., DRYN D., LOSKUTOVO., ZHOLOS A.

SUPPRESSION OF THE SMALL INTESTINE SHRINKABLE ACTIVITY AFTER USAGE OF THE ANESTHETIC KETAMINE

Summary. The work is devoted to the problem of general anesthetics side effects during surgical interventions. In particular, some of the common complications of anesthetics usage are intestinal motility disorders (eg, ileus), nausea and vomiting. We analyzed a clinical data of 60 patients who underwent analgosedation (AS) during coronary artery stenting. They were divided into 2 groups (1 group - AS with Diazepam and Fentanyl, 2 group - AS with Ketamine, Fentanyl and Propofol). Significantly more frequent manifestations of nausea in the perioperative period were identified in the group where ketamine was used. This formed the basis of the study of the molecular and cellular mechanisms of the effects of ketamine on the contractile activity of the smooth muscles of the small intestine.

Anesthetics are known to interact with receptors, G-proteins and ion channels, including transient receptor potential channels (TRP channels). The member of this superfamily, TRPC4 channel, which is coupled to muscarinic receptors (M2/M3 type) through G-protein activation and causes cholinergic excitation and contraction of small intestinal smooth muscles, may be a potential target for ketamine.

Thus, we aimed to investigate the effects of ketamine (100 μ M) on the muscarinic cation current (mICAT), which underlies cholinergic excitation-contraction coupling of visceral smooth muscles. All experiments were performed on single ileal myocytes freshly isolated from the longitudinal layer of the mouse ileum using patch-clamp techniques in the whole-cell configuration. mICAT was recorded using symmetrical Cs⁺ solutions (containing Cs⁺125 mM). [Ca²⁺]_i was 'clamped' at 100 nM using 10 mM BAPTA/4.6 mM CaCl₂ mixture. Measurements of isometric contractile force of the small intestinal smooth muscles were recorded using tensiometry techniques. It was showed that 100 μ M ketamine inhibits mICAT. mICAT initiated by the application of CCh (50 μ M) was suppressed on 64% (n=5) and mICAT, induced by intracellular GTP γ S (200 μ M) that interacts directly with the G-proteins (when muscarinic receptors are bypassed) was inhibited on 42% (n=5). Ketamine inhibited intestinal smooth muscle contractions evoked by carbachol (50 μ M) by about 40 % (n=5). Thus, we can conclude that both muscarinic receptors and G-proteins (or their coupling) are affected by ketamine, but the main sites of ketamine action appear to be the G-proteins. These data will provide basis for the molecular mechanisms of postoperative motility disorders and thus may be important for the development of novel approaches to the correction of such states.

Key words: muscarinic cation current, TRPC4 channels, small intestinal, ketamine, smooth muscles, nausea.