

Пригнічувальна дія загального анестетика кетаміну на транзієнти внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію та скорочення гладеньком'язових клітин тонкої кишки миші

М. І. Мельник^{1,2}, Д. О. Дринь¹, Д. О. Дзюба³, О.В. Жолос²

¹ Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ;

² Навчально-науковий центр «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка;

³ Національний університет охорони здоров'я України імені П.Л. Шупика, Київ;
e-mail: gribovatari@gmail.com

Механізми негативних наслідків дії загальних анестетиків на гладеньких м'язах практично не вивчалися. Мета нашої роботи – дослідити вплив загального анестетика кетаміну на внутрішньоклітинну концентрацію іонів кальцію в ізольованих міоцитах ileum та скоротливу активність гладеньком'язових смужок тонкої кишки миші. Вимірювали внутрішньоклітинну концентрацію іонів кальцію в клітинах за допомогою Ca^{2+} -чутливого флуоресцентного барвника Fura-2, скоротливу активність гладеньких м'язів реєстрували методом тензометрії. Було показано, що кетамін у концентрації 100 мкмоль/л значно (на 40%) пригнічував карбахоліндуковані скорочувальні реакції в клубовому відділі кишечника. Інгібуючий ефект корелював зі зниженням внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію у відповідь на дію карбахолу в ізольованих гладеньком'язових клітинах після додавання кетаміну у зовнішньоклітинний розчин, у середньому на 65%. Отримані результати покращують розуміння внутрішньоклітинних механізмів розвитку порушень моторики кишечника, що виникають після хірургічних операцій.

Ключові слова: гладенькі м'язи; тонка кишка; загальна анестезія; кетамін; кальцієва сигналізація; канали транзієнтного рецепторного потенціалу; тензометрія; агоніст і антагоніст TRPC4-каналів.

ВСТУП

Загальний механізм впливу анестетиків, що лежить в основі клінічних проявів їх дії на клітинному рівні, в основному залишається маловідомим. Дослідження впливу загальної анестезії на організм людини за останнє десятиліття показали, що дія анестетиків спрямована на клітинні мембрани, а саме на іонні канали, рецептори. Одним з найбільш широко вживаних внутрішньовенних анестетиків є кетамін, антагоніст глутаматних NMDA-рецепторів [1, 2]. Його перевагами є відсутність кардіодепресивного ефекту, збереження ларингіальних рефлексів та підтримання

спонтанної вентиляції, що особливо важливо при оперативних втручаннях зі збереженим спонтанним диханням. Зазвичай цей препарат використовується як основний анестетик, який викликає «дисоціативну» анестезію. Останнім часом збільшуються покази застосування субнаркоотичних доз (0,2–0,75 мг/кг), які створюють достатню анальгезію та опіоїдзберігаючі ефекти без особливих психотичних впливів [3]. Кетамін широко застосовується у польовій хірургії і зараз рекомендований як альтернатива морфіну для знеболювання на полі бою [4]. Він є ефективним засобом для лікування посттравматичного стресового розладу

© М. І. Мельник, Д. О. Дринь, Д. О. Дзюба, О.В. Жолос

(ПТСР) [5, 6]. Серед негативних наслідків його дії, що може суттєво обмежувати використання, слід зокрема відзначити парез кишечника або *ileus*, що спричиняє закрепи. Також показано, що кетамін впливає на кальцієві сигнальні шляхи в різних типах клітин [7, 8].

Кальцієва сигналізація відіграє важливу роль у спряженні збудження зі скороченням м'язів, а у генерації кальцієвих сигналів беруть участь клітинні рецептори, іонні канали, помпи тощо [9]. Дослідження порушень такої сигналізації є важливим як для розуміння механізмів дії загальної анестезії, зокрема кетаміну, так і для розробки нових препаратів, які застосовуються при операційному втручанні.

Іонізований кальцій (Ca^{2+}) є основним вторинним месенджером у клітинах гладеньких м'язів. Зростання внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), яке відбувається внаслідок його входу зовні у клітину та вивільнення з внутрішньоклітинних депо, є основним фактором, що викликає скорочення гладеньких м'язів [10]. Ca^{2+} надходить в клітину через потенціалзалежні кальцієві канали та рецепторкеровані Ca^{2+} -проникні катіонні канали, зокрема канали транзиснтного рецепторного потенціалу або TRP-канали [10]. Ці іонні канали є мультимодальними сенсорами і залучені, зокрема, у регуляцію скорочення різних типів гладеньких м'язів [11, 12]. У наших попередніх працях було показано інгібуючий вплив анестетика ізофлурану та кетаміну на одного з представників цієї великої родини TRPC4-каналів [7, 13]. Останні сумісно функціонують з мускариновими рецепторами і відіграють ключову роль у розвитку холінергічного спряження збудження зі скороченням в гладеньких м'язах тонкої кишки та внутрішньоклітинній сигналізації [14].

Вивільнення Ca^{2+} з внутрішньоклітинних депо, а саме з саркоплазматичного ретикулула (СР), відбувається через ріано-

динові рецептори (RyRs) та рецептори інозитолтрисфосфату (IP_3R). Підтримання гомеостазу $[\text{Ca}^{2+}]_i$ у гладеньком'язових клітинах – це складний процес і залежить від багатьох клітинних структур. Показано, що інгаляційні анестетики ізофлуран і галотан збільшують $[\text{Ca}^{2+}]_i$ у нейронах кори головного мозку та гіпокампа, і це пояснювалося зміною сигнальних шляхів, які впливають на синтез нейромедіаторів [15]. Севофлуран підвищує $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в нейронах, що викликає пошкодження мітохондрій та нейроапоптоз. Севофлураніндуковане збільшення цього показника може відбуватися через потенціалзалежні кальцієві канали L-типу [16].

Механізми підтримання $[\text{Ca}^{2+}]_i$ надзвичайно важливі для регуляції скоротливої активності гладеньких м'язів, і навіть несуттєві порушення кальцієвих сигнальних шляхів, в тому числі як побічний ефект після застосування загальної анестезії, можуть значно впливати на функції внутрішніх органів.

Мета нашого дослідження – вивчити вплив кетаміну на $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в гладеньком'язових клітинах, а також оцінити його дію на скорочення тонкої кишки миші.

МЕТОДИКА

Дослідження проводили на мишах-самцях (вік 3 міс) лінії Albino B6 середньою масою 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), Закону України № 3447 IV “Про захист тварин від жорстокого поводження”.

Виділення ізольованих клітин гладеньких м'язів тонкої кишки. Ізольовані клітини виділяли з поздовжнього шару тонкої кишки миші відділу *ileum*. Попередньо тварин піддавали евтаназії асфіксією з вико-

ристанням CO_2 . Після розтину черевної порожнини було виділено поздовжні гладенькі м'язи тонкої кишки відділу *ileum*, тоненькі смужки яких поміщали у модифікований розчин Кребса такого складу (ммоль/л): NaCl – 120, глюкоза – 12, HEPES – 10, KCl – 6, CaCl_2 – 2,5, MgCl_2 – 1,2; pH 7,4 (NaOH). Далі смужки нарізали на фрагменти розміром 1×1 мм та поміщали у безкальцієвий розчин Кребса такого складу (ммоль/л): NaCl – 120, глюкоза – 12, HEPES – 10, KCl – 6; pH 7,4 (NaOH). Наступним етапом була ферментативна інкубація клітин, котру проводили у безкальцієвому розчині Кребса з додаванням реагентів: колагенази типу 1А, бичачого сироваткового альбуміну та інгібітора трипсину, концентрація яких була 1 мг/мл. Ферментативну обробку тканини проводили на водяній бані протягом 17 хв при $36,8^\circ\text{C}$. Суспензію тричі відмивали від ферментів у безкальцієвому розчині Кребса і механічно розмішували скляними піпетками Пастера з різним діаметром кінчика. До отриманої клітинної суспензії додавали звичайний розчин Кребса у пропорції 1:2. Суспензію клітин розливали на покрівельні скельця, зберігали при 4°C і використовували в дослідях протягом 8 год.

Вимірювання $[\text{Ca}^{2+}]_i$ у ізольованих міоцитах тонкої кишки з використанням флуоресцентного барвника *Fura-2*. Зміни $[\text{Ca}^{2+}]_i$ у міоцитах тонкого кишечника вимірювали за допомогою чутливого до іонів кальцію барвника *Fura-2*. Останній завантажували за допомогою 30-хвилинної інкубації ізольованих міоцитів з 2 мкмоль/л *Fura-2-AM* (розведений із вихідного розчину, що містить 1 ммоль/л *Fura-2 AM* і 0,025% диметилсульфоксиду) з подальшим 20-хвилинним відмиванням розчином Кребса, щоб дати час для деестерифікації. Зміни $[\text{Ca}^{2+}]_i$ реєстрували, використовуючи довжину хвиль збудження 340 і 380 нм. Відносні зміни $[\text{Ca}^{2+}]_i$ зазначаються як коефіцієнти флуоресценції (F_{340}/F_{380}). Флуоресценцію реєстрували за допомогою інвертованого мікроскопа

Olympus IX71 із програмним забезпеченням для обробки зображень Olympus xCellence, яке використовує програмне забезпечення для обробки зображень cell[^]M/cell[^]R 3,3. («Olympus Optical Co., LTD», Японія). Клітини вважали інтактними, якщо у відповідь на дію карбахолу вони демонстрували зміну коефіцієнта флуоресценції $>10\%$ від базового рівня. Усі експерименти проводили при кімнатній температурі ($\sim 22^\circ\text{C}$).

Реєстрація скоротливої активності гладеньких м'язів кишечника. Скоротливі реакції гладеньких м'язів кишечника досліджували за допомогою методу тензометричної реєстрації (ізометричний режим) з використанням ємнісних датчиків напруження та комп'ютерної програми LabScribe3 («World Precision Instrument Inc.», США). Перед цим черевну порожнину миші розтинали, ділянку тонкої кишки швидко діставали і поміщали в модифікований розчин Кребса, що містив (ммоль/л): NaCl – 120, глюкоза – 12, HEPES – 10, KCl – 6, CaCl_2 – 2,5, MgCl_2 – 1,2; pH 7,4 (NaOH). Потім кишечник нарізали сегментами довжиною 1 см і поміщали в камеру, заповнену розчином Кребса-Рінгера. Склад цього розчину був таким (ммоль/л): NaCl – 133, NaHCO_3 – 16,3, NaH_2PO_4 – 1,38, KCl – 4,7, MgCl_2 – 1,05, глюкоза – 11,5, CaCl_2 – 2,73, HEPES – 10; pH 7,4 (NaOH). Препарати закріплювали в камері на двох сталевих гачках, один з яких був зафіксований стаціонарно, а інший приєднаний до тензодатчика. Для отримання оптимальної сили скорочення сегменти кишечника підлягали попередньому пасивному розтягненню з силою приблизно 0,5 г (перед початком дослідження, тензодатчик виставляли на «нуль»). Препарат перфузували розчином Кребса-Рінгера зі сталою швидкістю 1,5 мл/хв за допомогою чотириканального перистальтичного насоса IPS ISM 930 («Ismatec», Німеччина). Після 60 хв релаксації і адаптації м'язів у розчині реєстрували скоротливу активність.

Усі реактиви були виробництва фірми

«Sigma-Aldrich» (США) за виключенням кетаміну виробництва АТ «Фармак» (Київ, Україна) і (-)-енглерину А, який був люб'язно наданий колегами з університету Лідса (Велика Британія).

Статистична обробка результатів. Усі експериментальні результати наведено у вигляді середньої арифметичної (M) та її стандартної похибки (m) для певної вибірки (n). Відміни вважали статистично достовірними при $P < 0,05$. Аналіз результатів та побудову графіків проводили з використанням програми Origin 9.95 («Microcal Software Inc.», США).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Використовуючи Ca^{2+} -чутливий барвник Fura-2АМ для вимірювання $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ми перевірили, чи пригнічується Ca^{2+} -сигналізація кетаміном, і, якщо так, чи може вона бути відновлена селективним агоністом TRPC4-каналів, (-)-енглерином А. На прикладі типового експерименту показано (рис. 1, а), що застосування карбахолу – стабільного аналогу ацетилхоліну, викликало підвищення $[\text{Ca}^{2+}]_i$, тоді як кетамін пригнічував його. Середнє співвідношення F_{340}/F_{380} при максимальній відповіді на 50 мкмоль/л карбахолу становило $3,93 \pm 0,42$ ($n = 5$). При використанні кетаміну (100 мкмоль/л) це значення зменшувалося до $1,38 \pm 0,09$ ($P = 0,0003$), а додавання 10

нмоль/л (-)-енглерину А за наявності кетаміну відновлювало $[\text{Ca}^{2+}]_i$ у тій самій клітині (див. рис. 1, б). Середнє співвідношення F_{340}/F_{380} у відповідь на агоніст TRPC4-каналів було $2,93 \pm 0,08$ ($n = 5$), що не суттєво відрізнялося від контрольних значень ($P = 0,0475$).

Слід відмітити, що кетамін ефективно пригнічував не тільки тонічне карбахол-індуковане збільшення $[\text{Ca}^{2+}]_i$, а і кальцієві осциляції (рис. 2).

У наших попередніх дослідженнях [13] вже було показано вплив на гладенькі м'язи кишечника двох поширених у клінічній практиці загальних анестетиків: інгаляційного ізофлурану та внутрішньовенного кетаміну. Продемонстровано вплив інгаляційного анестетика ізофлурану на TRPC4-опосередкований мускариновий катіонний струм (mI_{KAT}) в ізольованих міоцитах тонкої кишки миші відділу *ileum*. Важливо було визначити на які саме мішені впливає ізофлуран, оскільки у вісцеральних гладеньком'язових клітинах експресуються мускаринові рецептори двох типів, M_2 і M_3 , які взаємодіють відповідно з двома різними типами G-білків – $G_{i/o}$ та $G_{q/11}$. Тому щоб визначити на яку саме мішень у цьому складному низхідному сигнальному шляху від мускаринового рецептора через G-білок і до самого TRPC4-каналу впливає анестетик, ми порівнювали його дію на активацію mI_{KAT} як при додаванні карбахолу, так і при

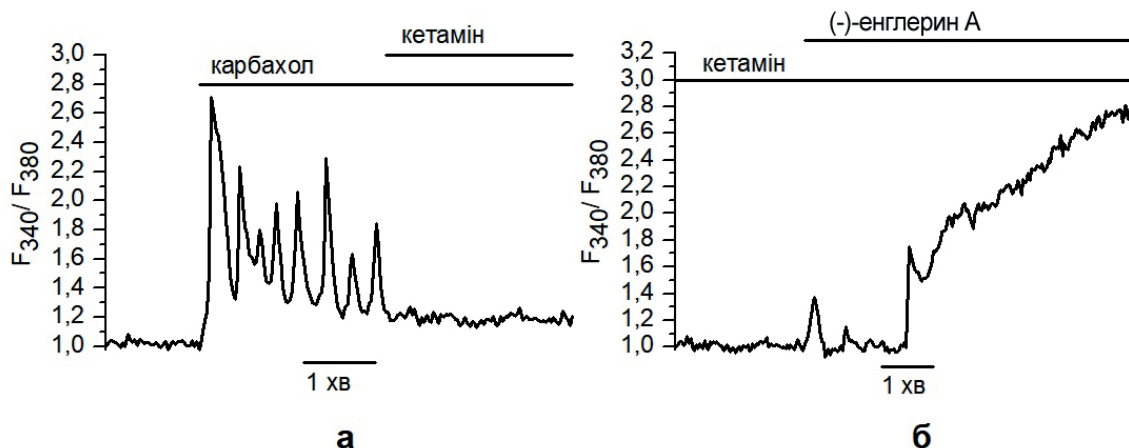


Рис. 1. Вплив кетаміну (а) та (-)-енглерину А (б) на кальцієву сигналізацію в ізольованих міоцитах *ileum* тонкої кишки миші

внутрішньоклітинній інфузії ГТФγS, що спричиняє пряму активацію всіх тримерних G-білків клітини без залучення відповідних спряжених з G-білками рецепторів. Був зроблений висновок, що ізофлуран не інгібує TRPC4-канали безпосередньо, а опосередковано пригнічує його активність через порушення взаємодії з активованими G-білками.

Кінцевою фізіологічною реакцією активації мускаринових рецепторів є скорочення міоцитів *ileum*, викликане підвищенням $[Ca^{2+}]_i$, яке виникає внаслідок як вивільнення Ca^{2+} з депо через сигнальний шлях M_3 /фосфоліпаза-C(PLC)/ IP_3 , так і через опосередковану MI_{KAT} деполяризацію мембрани, що активує потенціалкеровані Ca^{2+} -канали L-типу та призводить до входу Ca^{2+} ззовні. Загальноприйнято, що осциляції пов'язані з активацією системи $M_3/G_{q/11}/PLC$, синтезом IP_3 і вивільненням іонів кальцію з депо, тоді як тонічні скорочення в основному спричинені ініціацією MI_{KAT} і надходженням Ca^{2+} через Ca^{2+} -канали L-типу, активовані MI_{KAT} -індукованою деполяризацією мембрани [10]. Згідно з цією точкою зору, (-)-енглерин А як агоніст TRPC4 викликав переважно тонічне підвищення $[Ca^{2+}]_i$, але не ініціював його осциляцій. Інгібування осциляторних реакцій переконливо свідчить про те, що IP_3 -викликане вивільнення Ca^{2+} також пригнічується кетаміном, подібно до його дії

у мезентеріальних резистентних артеріях [17]. Якби за найпростішим сценарієм основною мішенню кетаміну була PLC, її інгібування пояснило б як пригнічення MI_{KAT} , який є PLC-залежним через виснаження фосфатидилінозитол-4,5-дифосфат (PIP_2) для його генерації, так і пригнічення карбахолвикликаних осциляцій $[Ca^{2+}]_i$, які вимагають синтезу IP_3 . У нашій попередній праці [7] показано, що (-)-енглерин А в наномолярних концентраціях повністю відновлював карбахоліндукований MI_{KAT} пригнічений кетаміном. У цій роботі ми демонструємо, що агоніст TRPC4-каналів відновлював також кальцієву сигналізацію, пригнічену за наявності кетаміну (див. рис. 1; 2).

Отримані результати не тільки сприяють кращому розумінню обмеженої користі антихолінергетичних засобів (препаратів, які зменшують розщеплення нейромедіатора ацетилхоліну) для лікування синдрому післяопераційного ілеусу [18]. Вони також показують, що активність мускаринових катіонних каналів, які ініціюють холінергічне спряження збудження зі скороченням в кишечнику, може бути відновлено застосуванням агоністів TRPC4-каналів. Тим не менше слід підкреслити, що (-)-енглерин А, хоча й відновлює MI_{KAT} за наявності кетаміну, навряд чи може використовуватися терапевтично, оскільки спричиняє стійке

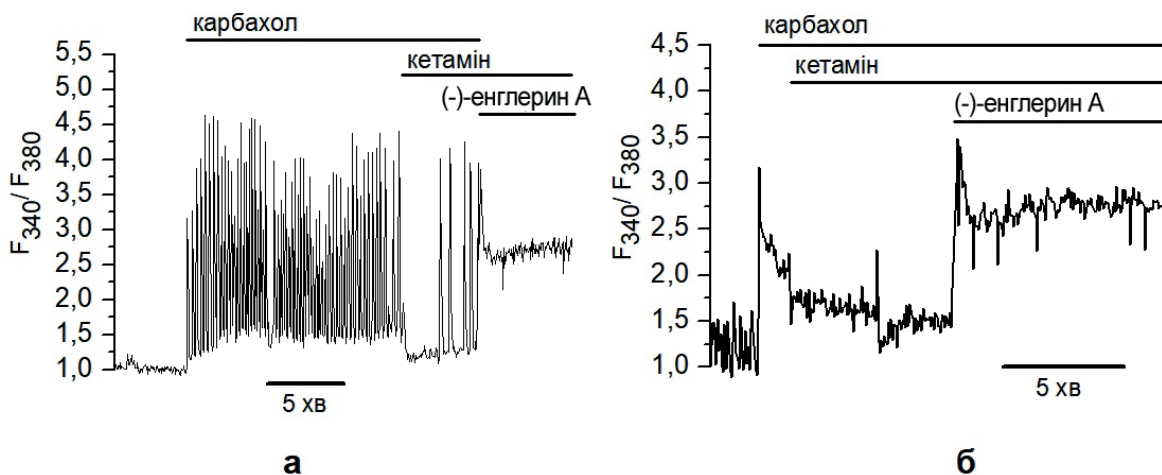


Рис. 2. Дія кетаміну та (-)-енглерину А на карбахолвикликані кальцієві осциляції (а) та тонічне збільшення $[Ca^{2+}]_i$ (б)

підвищення $[Ca^{2+}]_i$ (див. рис. 1; 2). Це питання потребує подальших окремих досліджень цитотоксичності (-)-енглерину А, який зараз найбільш відомий як протипухлинний препарат для лікування ракових захворювань нирок.

Наступним важливим функціональним тестом стало дослідження впливу кетаміну на викликані карбахолом і на спонтанні скорочення *ileum* тонкої кишки миші *in vitro* методом тензометрії в ізометричному режимі вимірювання. Слід відмітити, що препарат був фізіологічно активний і адекватно відповідав розвитком значного скорочення на додавання гіперкалієвого (60 ммоль/л) розчину (рис. 3, а). Далі після його відмивання, аплікація карбахола (50 мкмоль/л) ви-

кликала пікове фазне скорочення, а потім спостерігалось тонічне плато, амплітуду якого пригнічувала дія кетаміну (100 мкмоль/л). Дещо інший протокол досліду (показано на рис. 3, б), де після контрольного тесту на карбахол (50 мкмоль/л), з наступним 40-хвилинним відмиванням препарату у розчині Krebsу, в зовнішній розчин додавали кетамін (100 мкмоль/л) і після 20-хвилинної інкубації повторно вносили карбахол (50 мкмоль/л). Скоротлива відповідь на дію карбахолу після попередньої обробки препаратом кетаміном значно пригнічувалась і у середньому становила $59,46 \pm 4,93\%$ порівняно з контрольною реакцією на карбахол ($n = 6, P = 0,0004$).

Наступним важливим тестом стало дос-

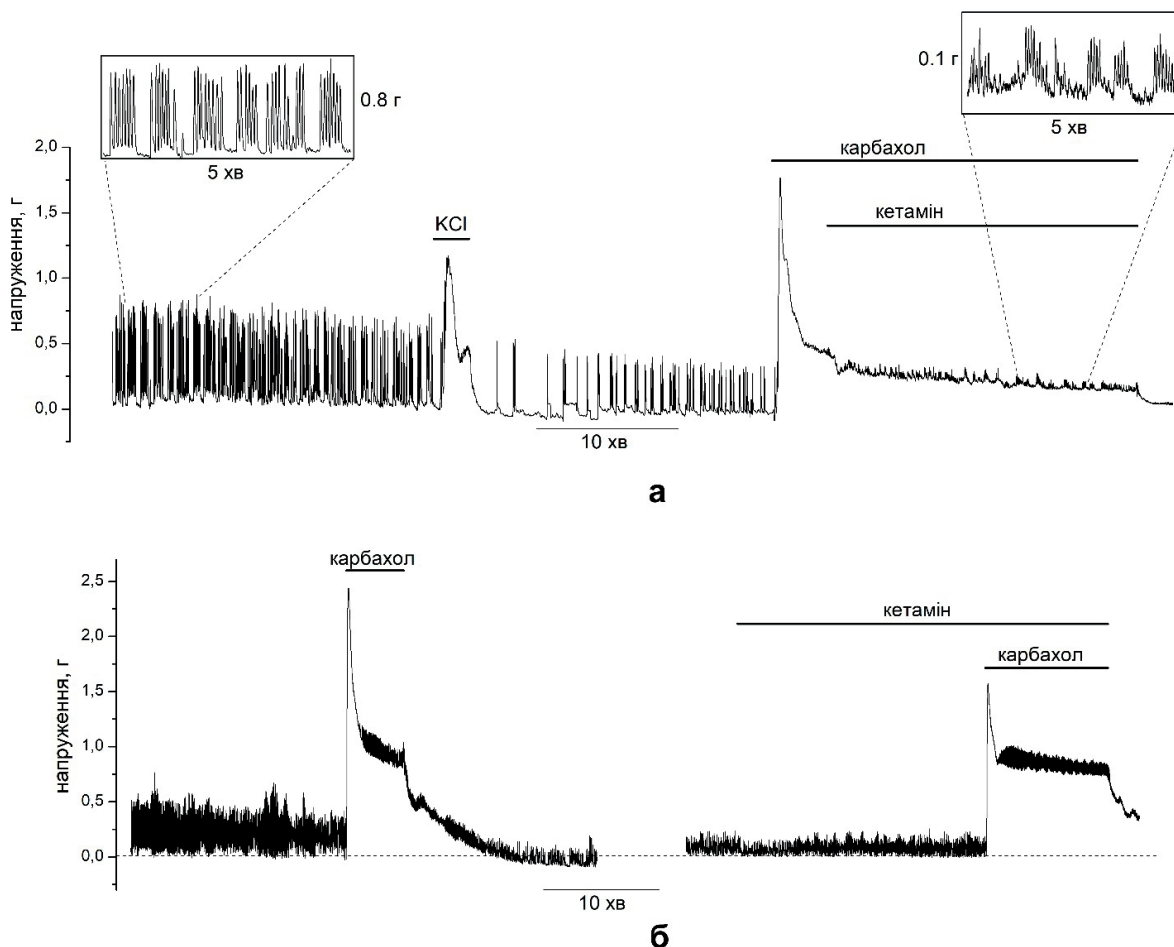


Рис. 3. Демонстративні тензометричні реєстрації пригнічення кетаміном карбахолвикликаних тонічних (а) та фазних (б) скорочень тонкої кишки миші

лідження дії кетаміну на спонтанні скорочення тонкої кишки миші. На рис. 4, а видно значне пригнічення кетаміном (100 мкмоль/л) амплітуди спонтанних скорочень, а також зміну їх ритмічності та форми. Зменшення амплітуди таких скорочень при дії кетаміну виникало відносно повільно і поступово (див. рис. 4, б). Спонтанна скоротлива активність тонкої кишки після застосування кетаміну становила $45,19 \pm 6,08\%$ порівняно з контролем ($n = 5$, $P = 0,0008$).

Отримані методом тензометрії результати пояснюють клінічні прояви післяопераційних розладів шлунково-кишкового тракту у пацієнтів і виявляють чутливість до дії анестетиків гладеньких м'язів, та важливу

роль у цьому ацетилхолінового шляху ініціації його скорочення. Варто відмітити, що нещодавні дані наших досліджень [13] також показали пригнічення на 30% викликаних дією карбахола (50 мкмоль/л) скорочень кишечника миші, зокрема *ileum* і *colon*, інгаляційним анестетиком ізофлураном (0,5 ммоль/л). Ці дані збігаються з отриманими результатами щодо дії кетаміну. На рис. 5 показано статистичний аналіз стосовно пригнічуючої дії кетаміну як на $[Ca^{2+}]_i$, так і на скорочення тонкої кишки. Як зазначалось вище, $[Ca^{2+}]_i$ зменшувалась у 2,8 раза після додавання кетаміну щодо відповіді на дію карбахола та відновлювалася після аплікації (-)-енглєрину А (рис. 5, а). Так само кетамін

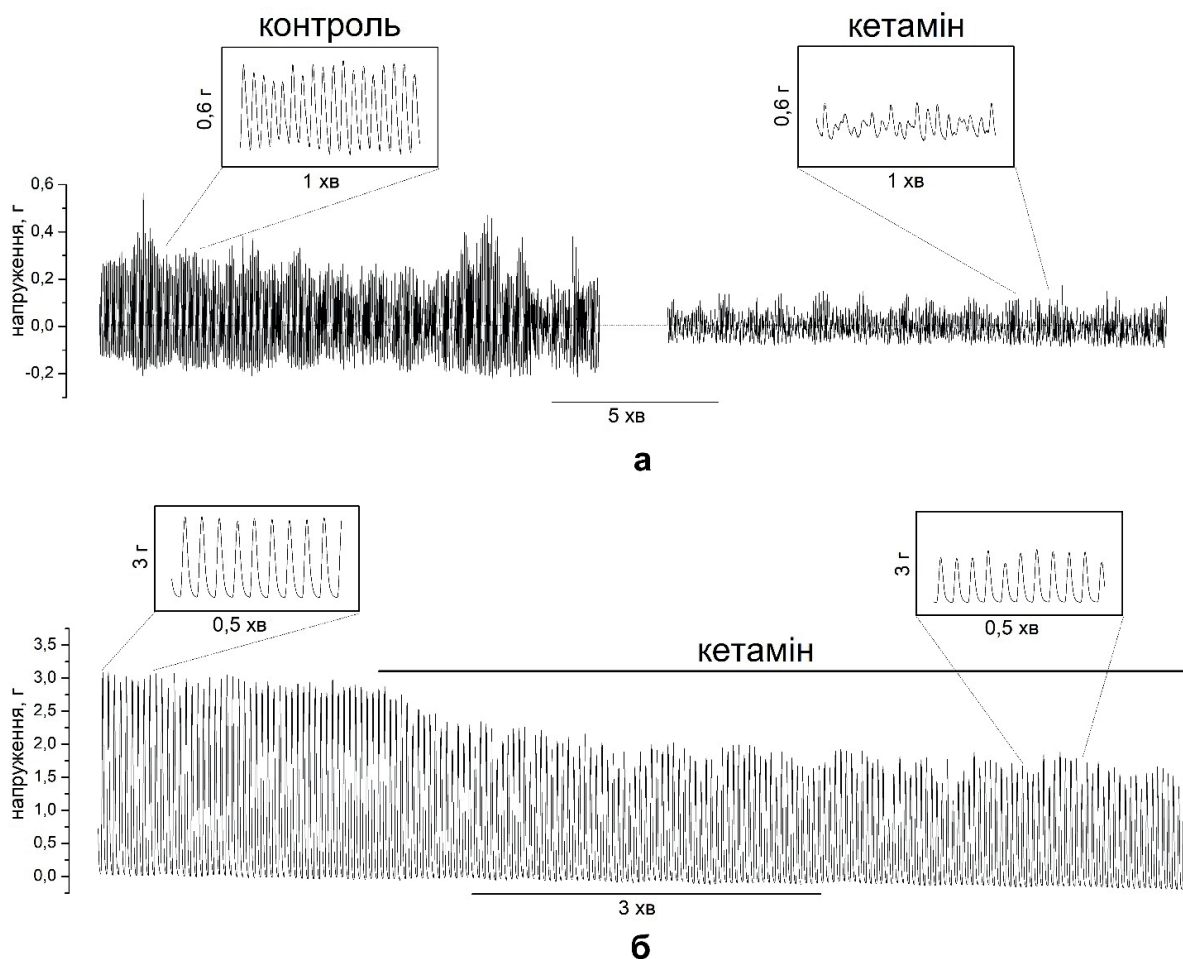


Рис. 4. Демонстративні тензометричні реєстрації пригнічення кетаміном спонтанної активності тонкої кишки миші: зміни характеру спонтанних скорочень (а) та зменшення їх амплітуди (б)

пригнічував і карбахолвикликані скоротливі реакції тонкої кишки, а також спонтанні скорочення (вдвічі; див. рис. 5, б).

Хоча кетамін є одним з найбільш розповсюджених у медичній практиці загальних анестетиків та важливим компонентом сучасної збалансованої анестезії, але останнім часом його розглядають і як потенційний антидепресант [19, 20]. Кетамін як новітній фармако-терапевтичний засіб можна застосовувати для лікування ПТСР, особливо у більш складних випадках [21].

Нещодавні дослідження показали, що деякі новосинтезовані модулятори TRP-каналів мають властивості антидепресантів. Так, ідентифікований інгібітор TRPC4/C5-каналів M084 проявив антидепресивну та анксиолітичну дію [22], як і HC-070, новий низькомолекулярний антагоніст цих каналів, виявив антидепресивну дію і може бути запропонований для лікування низки психічних симптомів [23]. Водночас важливо, що використовувані у медицині антидепресанти та анестетики мають побічну дію на TRP-канали. Було показано, що трициклічні антидепресанти інгібували TRPC4-канали у міоцитах товстої кишки, що в результаті

викликало пригнічення моторики [24]. Ці дані збігаються з нашими нещодавніми результатами дослідження, які демонструють інгібуючу дію анестетика кетаміну та ізофлурану на опосередкований TRPC4-каналами мускариновий катіонний струм міоцитів тонкої кишки миші [7, 13]. Речовини різного хімічного складу та дії (як анестетики, так і антидепресанти) крім їх впливу на рівні ЦНС, можуть пригнічувати моторику шлунково-кишкового тракту, зменшувати швидкість кишкового транзиту, що обмежує клінічні застосування. Для подолання цих негативних побічних ефектів можна запропонувати комбіновану терапію з використанням селективних агоністів TRPC4-каналів.

Нині вивчення побічної дії як анестетиків, так і антидепресантів на TRP-канали, зокрема у міоцитах кишечника є надзвичайно актуальною задачею. Результати таких досліджень дадуть змогу запровадити певні рекомендації щодо оптимізації протоколів застосування та дозування окремих видів цих препаратів у медичній практиці, зокрема і при лікуванні ПТСР. Також варто зазначити, що є дуже перспективним скринінг інших широко вживаних у клінічній практиці загальних

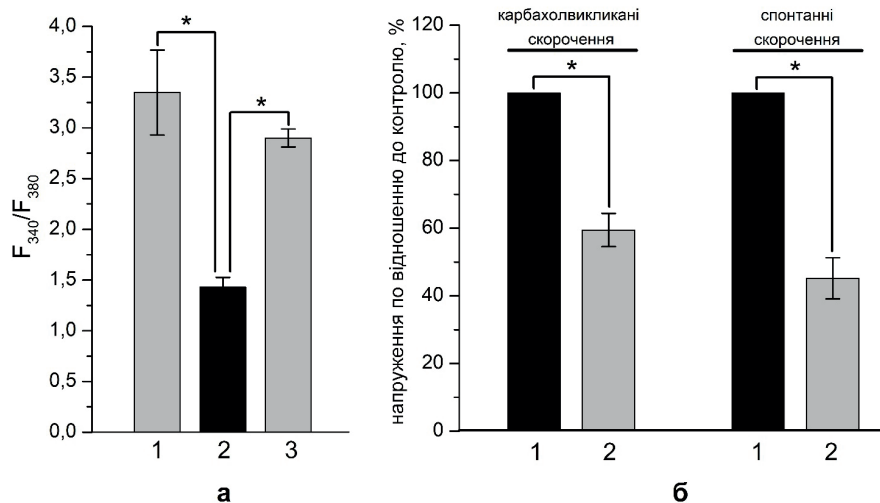


Рис. 5. Статистичний аналіз зміни внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію в гладеньком'язових клітинах *ileum* миші (а) під дією карбахолу (1), кетаміну (2) й (-)-енглерину А (3) ($n = 5$) та скоротливих реакцій тонкої кишки (б) внаслідок дії кетаміну (2) як карбахолвикликаних ($n = 6$), так і спонтанних ($n = 5$), нормованих у відсотках на скорочення у контролі (1). * $P < 0,05$ порівняно з контролем

анестетиків, зокрема дезфлурану, севофлурану, мідазоламу, дексметомедину, пропофолу, сучасних похідних фентанілу, таких, як суфентаніл та альфентаніл на кальцієву сигналізацію гладеньком'язових клітин та скоротливу активність тонкої кишки. Отримані результати передбачають, що основними мішенями анестетика кетаміну є мускаринові рецептори та/або G-білки, які можуть порушувати моторику кишечника внаслідок застосування загального наркозу як одного з поширених післяопераційних ускладнень.

ВИСНОВКИ

1. Дія кетаміну значно пригнічує викликане карбахолом збільшення $[Ca^{2+}]_i$ в гладеньком'язових клітинах тонкої кишки миші відділу *ileum*.

2. Селективний агоніст TRPC4-каналів (-)-енглерин А відновлює $[Ca^{2+}]_i$ після дії кетаміну.

3. Вплив кетаміну зменшує спонтанні та карбахоліндуковані скорочення *ileum* миші.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of co-authors of the article.

Автори наукової роботи висловлюють подяку Збройним Силам України за захист та можливість продовжувати виконувати дослідження в Україні.

Дослідження були проведені за підтримки Гранту НАН України дослідницьким лабораторіям/групам молодих вчених НАН України для проведення досліджень за пріоритетними напрямками розвитку науки і техніки у 2022-2023 рр. (0122U002126); Міністерства освіти і науки України (грант 0122U001535).

M.I. Melnyk^{1,2}, D.O. Dryn¹, D.O. Dziuba³, A.V. Zholos²

INHIBITORY ACTION OF THE GENERAL ANESTHETIC KETAMINE ON INTRACELLULAR CALCIUM TRANSIENTS AND SMOOTH MUSCLE CONTRACTIONS OF THE MOUSE SMALL INTESTINE

¹ O.O. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;

² ESC "Institute of Biology and Medicine", Taras Shevchenko National University of Kyiv;

³ Shupyk National Healthcare University of Ukraine, Kyiv; e-mail: gribovamari@gmail.com

The mechanisms of the negative consequences of general anaesthetics action on the nervous system have been studied in detail, but regarding smooth muscle function, such issues have not yet been sufficiently addressed. In this study, we investigated the effect of the general intravenous anaesthetic ketamine on the level of intracellular calcium in isolated *ileum* myocytes and the contractile activity of smooth muscle strips of the mouse small intestine. The concentration of intracellular calcium in cells was measured using the Ca^{2+} -sensitive fluorescent dye Fura-2, and tensiometry was used to record the contractile activity of smooth muscles. It was shown that ketamine at a concentration of 100 μ M significantly, by 40%, suppressed carbachol-induced contractile reactions of the *ileum*. The inhibitory effect correlated with the suppression of the intracellular calcium responses to carbachol in isolated smooth muscle cells after the addition of ketamine to the extracellular solution, which was by 65% on average. These results contribute to our better understanding of the possible membrane and intracellular mechanisms of the development of post-surgical intestinal motility disorders.

Key words: smooth muscles; small intestine; general anesthesia; ketamine; calcium signaling; transient receptor potential channels; contraction recordings; TRPC4 channels agonist and antagonist.

REFERENCES

1. Zhou C, Liu J, Chen X-D. General anesthesia mediated by effects on ion channels. *World J Crit Care Med.* 2012 Jun 4;1(3):80-93.
2. Brannigan G, LeBard DN, Hénin J, Eckenhoof RG, Klein ML. Multiple binding sites for the general anesthetic isoflurane identified in the nicotinic acetylcholine receptor transmembrane domain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010 Aug 10;107(32):14122-7.
3. Nowacka A, Borczyk M. Ketamine applications beyond anesthesia - A literature review. *Eur J Pharmacol.* 2019 Oct 5;860:172547.
4. de Rocquigny G, Dubecq C, Martinez T, Peffer J, Cauet A, Travers S, Pasquier P. Use of ketamine for prehospital pain control on the battlefield: A systematic review. *J*

- Trauma Acute Care Surg. 2020 Jan;88(1):180-5).
5. Feder A, Costi S, Rutter SB, Collins AB, Govindarajulu U, Jha MK, et al. A randomized controlled trial of repeated ketamine administration for chronic posttraumatic stress disorder. *Am J Psychiatr*. 2021 Feb 1;178(2):193-202.
6. Liriano F, Hatten C, Schwartz TL. Ketamine as treatment for post-traumatic stress disorder: a review. *Drugs Context*. 2019 Apr 8;8:212305.
7. Melnyk MI, Dryn DO, Al Kury LT, Dziuba DO, Zholos A V. Suppression of mI_{CAT} in mouse small intestinal myocytes by general anaesthetic ketamine and its recovery by TRPC4 agonist (-)-englerin A. *Front Pharmacol*. 2020 Dec 18;11:594882.
8. Wiryana M, Sinardja I, Budiart I, Gde T, Senapathi A, Widnyana M, et al. Low dose ketamin. *Bali J Anesthesiol*. 2022 Jan 1;1(1):13.
9. Berridge MJ. The inositol trisphosphate/calcium signaling pathway in health and disease. *Physiol Rev*. 2016 Oct 1;96(4):1261-96.
10. Bolton TB, Prestwich SA, Zholos AV, Gordienko DV. Excitation-contraction coupling in gastrointestinal and other smooth muscles. *Annu Rev Physiol*. 1999;61:85-115.
11. Dryn D, Melnyk M, Kizub I, Hu H, Soloviev A, Zholos A. The role of TRPV4 cation channels in the regulation of phenylephrine-induced contraction of rat pulmonary artery. *Fiziol Zh*. 2016;62(2):79-86. [Ukrainian].
12. Boldyrev OI, Sotkis HV, Kuliieva IM, Vladymyrova IA, Filippov IB, Skryma R, et al. Expression of the cold receptor TRPM8 in the smooth muscles of the seminal ejaculatory ducts in rats. *Fiziol Zh*. 2009;55(5):17-27. [Ukrainian].
13. 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. *Eur J Pharmacol*. 2018 Feb 5;820:39-44.
14. Dresviannikov AV, Zholos AV, Shuba MF. Single nonselective cation channels activated by muscarinic agonists in smooth muscle cells of the guinea-pig small intestine. *Fiziol Zh*. 2004;50(4):85-91. [Ukrainian].
15. Kindler CH, Eilers H, Donohoe P, Ozer S, Bickler PE. Volatile anesthetics increase intracellular calcium in cerebrocortical and hippocampal neurons. *Anesthesiology*. 1999 Apr;90(4):1137-45.
16. Zhu X, Yao Y, Guo M, Li J, Yang P, Xu H, Lin D. Sevoflurane increases intracellular calcium to induce mitochondrial injury and neuroapoptosis. *Toxicol Lett*. 2021 Jan 1;336:11-20.
17. Akata T, Izumi K, Nakashima M. Mechanisms of direct inhibitory action of ketamine on vascular smooth muscle in mesenteric resistance arteries. *Anesthesiology*. 2001 Aug;95(2):452-62.
18. Lubawski J, Saclarides TJ. Postoperative ileus: strategies for reduction. *Ther Clin Risk Manag*. 2008 Oct;4(5):913-7.
19. Kohtala S. Ketamine-50 years in use: from anesthesia to rapid antidepressant effects and neurobiological mechanisms. *Pharmacol Rep*. 2021 Apr 1;73(2):323-45.
20. Hashimoto K. Rapid-acting antidepressant ketamine, its metabolites and other candidates: A historical overview and future perspective. *Psychiatr Clin Neurosci*. 2019 Oct 1;73(10):613-27.
21. Feder A, Rutter SB, Schiller D, Charney DS. The emergence of ketamine as a novel treatment for posttraumatic stress disorder. *Adv Pharmacol*. 2020 Jan 1;89:261-86.
22. Yang LP, Jiang FJ, Wu GS, Deng K, Wen M, Zhou X, et al. Acute treatment with a novel TRPC4/C5 channel inhibitor produces antidepressant and anxiolytic-like effects in mice. *PLoS One*. 2015 Aug 28;10(8).
23. Just S, Chenard BL, Ceci A, Strassmaier T, Chong JA, Blair NT, et al. Treatment with HC-070, a potent inhibitor of TRPC4 and TRPC5, leads to anxiolytic and antidepressant effects in mice. *PLoS One*. 2018 Jan 31;13(1):e0191225.23.
24. Jeong B, Sung TS, Jeon D, Park KJ, Jun JY, So I, et al. Inhibition of TRPC4 channel activity in colonic myocytes by tricyclic antidepressants disrupts colonic motility causing constipation. *J Cell Mol Med*. 2022 May 12;00:1-13.

Матеріал надійшов до редакції 07.10.2022