

ЕКСПЕРИМЕНТАЛНО ПРОУЧВАНЕ РОЛЯТА НА 5-НТ₃ СЕРОТОНИНОВИТЕ РЕЦЕПТОРИ В МЕХАНИЗМА НА ПРОТИВОВЪЗПАЛИТЕЛНИЯ И АНТИХИПЕРАЛГЕЗИЧЕН ЕФЕКТ НА АНТИДЕПРЕСАНТА КЛОМИПРАМИН

Костадинов И, Делев Д, Костадинова И

Катедра Фармакология и Клинична фармакология, МУ – Пловдив

EXPERIMENTAL STUDY ON THE INVOLVEMENT OF 5-HT₃ SEROTONIN RECEPTORS IN THE MECHANISM OF ANTI-INFLAMMATORY AND ANTIHYPERALGESIC EFFECT OF THE ANTIDEPRESSANT CLOMIPRAMINE

Kostadinov I, Delev D, Kostadinova I

*Department Pharmacology and Clinical pharmacology Medical University – Plovdiv
kostadinovilia@gmail.com*

ABSTRACT

Introduction: In experimental conditions antidepressive drugs have anti-inflammatory and antihyperalgesic activity. The mechanism of these effects is not fully understood. The **aim** of the present study is to investigate the role of 5-HT₃ receptors in the mechanism of anti-inflammatory and antihyperalgesic action of tricyclic antidepressant clomipramine. **Material and methods:** 40 male Wistar rats were divided in five groups (8 animals each): control, treated with saline; positive control, treated with diclofenac and three experimental groups treated with clomipramine 20 mg/kg bw, ondansetron 0,5 mg/kg bw (5-HT₃ antagonist) and clomipramine + ondansetron. Inflammation was induced with intraplantar injection of 1 % solution of carrageenan before treatment. Anti-inflammatory effect was measured by reduction of carrageenan-induced paw edema on the 2nd, 3rd, 4th and 24th hour. Nociceptive test (Randall & Selitto) which employ mechanical (paw pressure) stimulus was used. To evaluate the analgesic effect was used decrease in latency to withdraw the inflamed paw. **Results:** Clomipramine significantly inhibited carrageenan-induced paw edema on the 2nd, 3rd, 4th and 24th hour, when compared with control (p<0,05). Ondansetron did not show significant differences with control in the first three testings but on the 24th hour statistically reduced carrageenan-induced edema (p<0,05). The group with co-administration of clomipramine and ondansetron did not show significant difference when compared with saline. Clomipramine significantly enhanced latency in paw pressure test (Randall & Selitto) versus saline (p<0,05). In clomipramine + ondansetron treated group was observed non-significant decrease in latency in the first two testings and significant decrease on the 3rd hour (p<0,05) when compared with control. **Conclusion:** Clomipramine has anti-inflammatory and antihyperalgesic effect in carrageenan model of inflammation which is mediated through the action of serotonin on 5-HT₃ receptors.

Key words: clomipramine, carrageenan, 5-HT₃ receptors, inflammation, antihyperalgesia

Антидепресантите са клас лекарствени средства, които включва хетерогенни по своята структура и механизъм на действие субстанции. Кломипраминът е трициклически антидепресант, който увеличава концентрацията на 5-НТ и норадреналин в синапсите на централната нервна система чрез блокиране на пресинаптичния невротрансмитерен рецептор. През последните години в литературата се откриват данни за противовъзпалителна и антихипералгезична активност на антидепресантите. В тази насока съществуват редица проучвания на тези ефекти при експериментални модели на болка и възпаление.

Един от често използваните методи касае проучване ефекта им върху степента на редукция на карагениновия оток като показател за антиинфламаторно действие. Трициклическите антидепресанти амитриптилин, имипрамин и кломипрамин демонстрират сигнификантен противовъзпалителен ефект при този модел на възпаление (1).

Механизмът по който антидепресантите повлияват възпалението не е ясен. 5-HT₃ рецепторите са експресирани в мозъчни области, играещи роля в интеграцията на рефлексна на повръщане, обработката на ноцицептивната информация, контрола върху когнитивните функции и тревожността (2). Редица автори съобщават за участие на 5-HT₃ рецепторите в антиноцицепцията индуцирана от антидепресантите. 5-HT₃ рецепторният антагонист ондансетрон инхибира антиноцицептивния ефект на имипрамин при интраперитонеално въвеждане (3). Открити са и екстраневронални локализации на тези рецептори, а именно в имунни клетки като моноцити и Т-клетки. Това предполага тяхната роля в имунологични процеси и възпалението (4).

Цел на настоящето проучване е да се установи ролята на 5-HT₃ серотониновите рецептори в противовъзпалителния и антихипералгезичен ефект на трицикличния антидепресант кломипрамин при карагенинов модел на възпаление.

Материал и методи

Експериментът е одобрен от Комисията по етика при животните към Българската агенция по безопасност на храните (БАБХ) с разрешително N 56/19.03.2012 година.

Животни

Използвани бяха 40 мъжки бели плъха порода Wistar разделени чрез случаен подбор в пет групи (n = 8), третираны както следва:

I група (контрола) – третирана с физиологичен разтвор интраперитонеално (i. p.); II група (позитивна контрола) – третирана с референтно противовъзпалително и аналгетично вещество – диклофенак в доза 25 mg/kg т. м. (i. p.); III група – третираны с кломипрамин в доза 20 mg/kg т. м. (i. p.); IV група – третираны с 5-HT₃ рецепторния антагонист ондансетрон в доза 0,5 mg/kg т. м. (i. p.); V група – третираны с кломипрамин 20 mg/kg т. м. + ондансетрон 0,5 mg/kg т. м. (i. p.).

Метод за изследване на противовъзпалително действие.

Използва се апарат плетизмометър (Ugo basile, Italy). Преди третирането се измерва обема на задната дясна лапа на животните от всички групи. След това на всички животни интраплаттарно се инжектира 0,1 мл от 1% разтвор на карагенин. Непосредствено след това се инжектират интраперитонеално изследваните вещества. С апарат плетизмометър (Ugo basile) се отчита обемът изместена течност от задната дясна лапа на плъха на втория, третия, четвъртия и 24 час след третирането с карагенин. Изчислява се по формулата на Тринус процента на инхибиране на възпалението.

Метод за изследване на антихипералгезично действие

Използва се апарат аналгезиметър (Ugo basile, Italy). Тестът е описан от Randall & Selitto (1957). Използва се механичен болков стимул. Ноцицептивният праг се измерва като се прилага натиск върху възпалената лапа на плъха. Отчита се в условни единици (сантиметри) силата на натиска при която животното отдръпва тестираната лапа. Максималният натиск е 25 см. За статистическата обработка беше използван показателят: максимален възможен ефект (% MPE – maximal possible effect) изчислен по формулата:

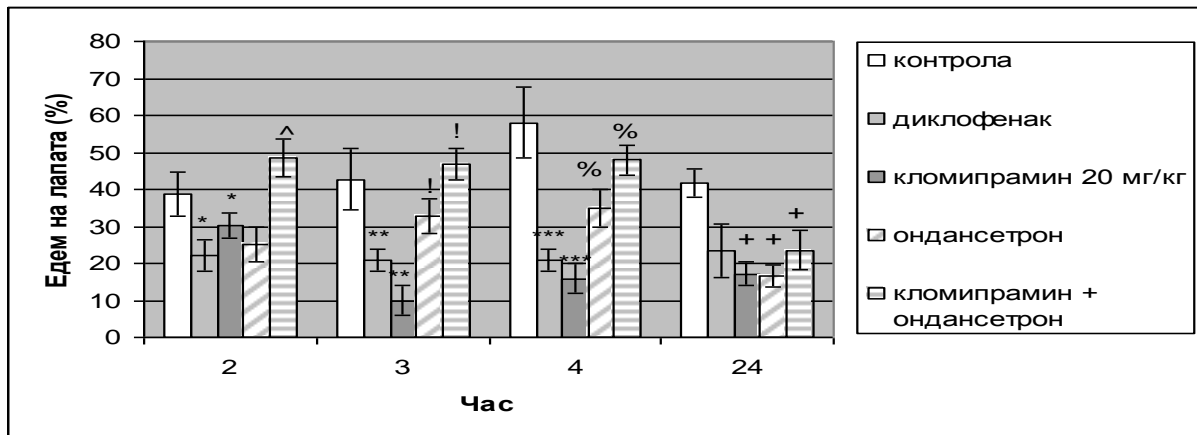
$$\%MPE = (\text{Стойност след третиране} - \text{стойност преди третиране} / 25 - \text{стойност преди третиране}) \times 100.$$

За статистическа обработка на данните беше използван метода на вариационния анализ – One Way Anova на програмата SPSS 11. За всеки показател бяха определени средна аритметична стойност (mean) и стандартната грешка (\pm SEM). Сравняването на резултатите между групите беше извършено с помощта на Independent Sample T test при уровень на значимост $P < 0,05$.

Резултати

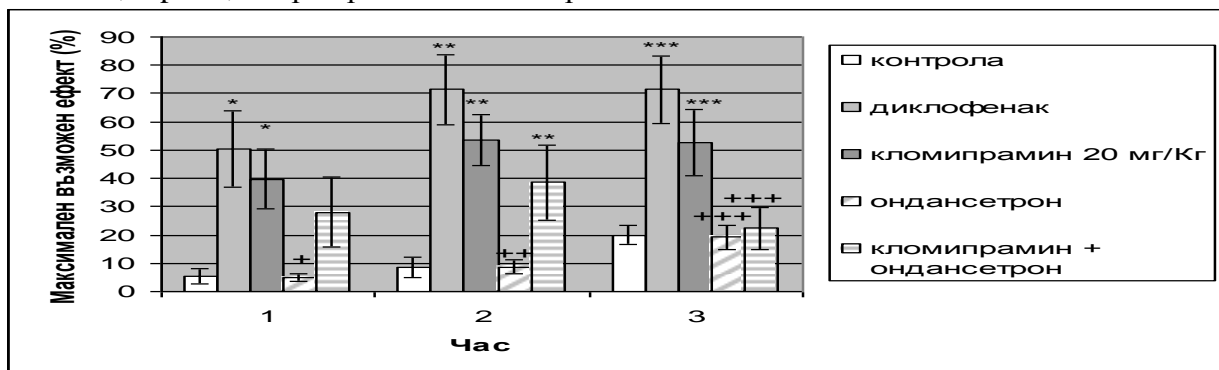
Кломипраминът сигнификантно инхибира карагениновия оток на втория ($p = 0,002$), третия ($p = 0,003$), четвъртия ($p = 0,003$) и 24 ($p = 0,003$) час при съпоставяне с контролата. Няма статистически значима разлика между противовъзпалителния ефект на кломипрамина

и този на диклофенака, използван като еталон на антиинфламаторно действие. Ондансетронът не притежава противовъзпалителен ефект *per se* при първите три тестванея, но на 24 час сигнификантно редуцира карагениновия оток ($p < 0,0001$) при сравнение с третираните с физиологичен разтвор животни. Групата третирана с кломипрамин + ондансетрон не показва достоверни разлики при сравнение с контролата (с изключение на 24 час), но при съпоставяне с групата третирана само с кломипрамин се установи достоверно по-слаб ефект върху инхибицията на отока на втория, третия и четвъртия час ($p < 0,0001$). (фиг. 1).



Фиг. 1. Влияние на 5-НТ₃ рецепторния антагонист ондансетрон върху противовъзпалителния ефект на кломипрамин при карагенинов модел на възпаление.

* $p < 0,05$ при сравнение с контрола на втория час; ** $p < 0,05$ при сравнение с контрола на третия час; *** $p < 0,05$ при сравнение с контрола четвъртия час; ^ $p < 0,05$ при сравнение с кломипрамин и диклофенак на втория час; % $p < 0,05$ при сравнение с кломипрамин и диклофенак на четвъртия час ! $p < 0,05$ при сравнение с кломипрамин и диклофенак на третия час; + $p < 0,05$ при сравнение с контрола на 24 час.



Фиг. 2. Влияние на 5-НТ₃ рецепторния антагонист ондансетрон върху антиноцицептивния ефект на кломипрамин при модел на възпаление с карагенин. * $p < 0,05$ при сравнение с контрола на първия час; ** $p < 0,05$ при сравнение с контрола на втория час; *** $p < 0,05$ при сравнение с контрола на третия час; + $p < 0,05$ при сравнение с кломипрамин и диклофенак на първия час; ++ $p < 0,05$ при сравнение с кломипрамин и диклофенак на втория час; +++ $p < 0,05$ при сравнение с кломипрамин и диклофенак на третия час.

При възпалителен болков модел кломипраминът сигнификантно увеличи силата на натиска за отдръпване на лапата при теста на Randall & Selitto на първия ($p = 0,007$), втория ($p < 0,0001$) и третия ($p = 0,018$) час при сравнение с контролата. Групата, третирана с ондансетрон в допълнение към кломипрамина значимо увеличи този показател само на втория час ($p = 0,046$) при съпоставяне с контролата. Групата получила кломипрамин +

ондансетрон недостоверно намали проследявания показател на първия час и сигнификантно на третия час ($p = 0,05$) при сравнение с кломипрамин-третираната група (фиг. 2).

Обсъждане

Представените данни сочат, че антидепресанта кломипрамин в използваната доза 20 мг/кг т. м. притежава изразен антиинфламаторен ефект при карагенинов модел на възпаление. Този ефект се регистрира в ранната и късна фаза на възпалението. Получените данни подкрепят тези на Abdel-Salam et al за противовъзпалителна активност на кломипрамина при използвания модел на възпаление (1). В допълнение установихме изразен антихипералгезичен ефект при използване на механичен болков стимул. С цел установяване евентуалната роля на 5-НТ₃ рецепторите в механизма на тези ефекти кломипрамина беше прилаган в комбинация с антагониста им ондансетрон.

В ЦНС 5-НТ₃ рецепторите са разположени предимно пресинаптично. Тази локализация е във връзка с физиологичната им роля да контролират освобождаването на невротрансмитери (5). 5-НТ₃ рецепторите играят важна роля в авторегулацията на серотониновото освобождаване, като го стимулират. Доказано е, че те стимулират този процес в срезове от хипокамп на плъх без да са тонично активирани (6). В ЦНС серотонинът медира антиинфламаторен ефект Интрацеребровентрикуларното му въвеждане редуцира предизвиканото с карагенин възпаление (7). Също така супресия на имунните функции се наблюдава от серотонин освобождаващи субстанции, като амфетамин (8). От друга страна на ниво гръбначен мозък 5-НТ₃ рецепторите нямат модулиращо действие върху карагениновото възпаление тъй като интратекалното приложение на ондансетрон не оказва влияние върху степента на отока (9). Посочените данни и получените резултати за антагонизиране ефекта на кломипрамин от ондансетрон в първите 4 часа при остро третиране, свидетелства за участие на супраспиналните 5-НТ₃ рецептори в механизма на този ефект.

В периферните тъкани 5-НТ₃ рецепторите са локализираны върху клетки, въввлечени във възпалението, включително такива на имунната система. С RT-PCR те се откриват в моноцитите, Т-клетките, хондроцитите и синовиалните клетки.(4). Експресирани върху Т-клетките 5-НТ₃ рецептори имат активизираща функция (10). Действието на натрупания от кломипрамина серотонин върху 5-НТ₃ рецепторите би могло да води до отслабване на противовъзпалителния му ефект. В настоящето проучване ондансетронът не антагонизира противовъзпалителния ефект на кломипрамина само на 24 час.

5-НТ₃ рецепторите със своята локализация в първичните ноцицептивни аференти на дорзалния спинален рог, моноаминергичните десцендентни инхибиторни пътища, периферните нервни окончания и автономните аферентни влакна играят съществена роля в спиналната болкова трансмисия и ендогенната супресия на болката. Съществуват доказателства, че 5-НТ индуцираната антиноцицепция на спинално ниво се медира от 5-НТ₃ рецепторите (11). В спиналния заден рог 5-НТ₃ рецепторите са експресирани соматодендритно (постсинаптично) и в пресинаптичните терминали на ГАМК ергичните интерневрони, където усилват инхибиторния ефект на ГАМК. Последната реализира антиноцицептивен ефект. Експерименталните данни сочат, че 5-НТ₃ рецепторите са експресирани и в субпопулация от енкефалинергични неврони в спиналния заден рог (12). Приведените факти обясняват антагонизирането на аналгетичния ефект на кломипрамина от ондансетрона върху възпалителен болков модел при теста на Rndall & Sellitto. Ондансетронът като антагонист на 5-НТ₃ рецепторите прекъсва комуникацията между серотонина, ГАМК и енкефалините и сигнификантно редуцира 5-НТ медираната антиноцицепция. Това дава основание да допуснем, че при възпаление антихипералгезичния ефект кломипрамина се осъществява на спинално ниво и 5-НТ₃ рецепторите играят съществена роля.

Изводи

1. Кломипраминът притежава противовъзпалителен и антихипералгезичен ефект при карагенинов модел на възпаление. 2. Супраспинално локализираните 5-HT₃ рецептори медирират противовъзпалителния ефект на кломипрамина в ранната фаза на карегининовия оток. 3. Спинално локализираните 5-HT₃ рецептори отчасти медирират антихипералгезичния ефект на кломипрамин при възпалителен болков модел.

Библиография

1. Abdel-Salam, O.M., Nofal, S.M., El Shenawy, S.M.. Evaluation of the antiinflammatory and anti-nociceptive effects of different antidepressants in the rat. *Pharmacol Res.* 2003 Aug;48(2):157-65.
2. Holbrook, J. D., Gill, C. H., Zebda, N., et al. Characterisation of 5-HT_{3C}, 5-HT_{3D} and 5-HT_{3E} receptor subunits: evolution, distribution and function. *J Neurochem.* 2009 Jan;108(2):384-96.
3. Yokogawa F, Kiuchi Y, Ishikawa Y, et al. An investigation of monoamine receptors involved in antinociceptive effects of antidepressants. *Anesth Analg.* 2002 Jul;95(1):163-8.
4. Fiebich BL, Akundi RS, Seidel M, et al Expression of 5-HT_{3A} receptors in cells of the immune system. *Scand J Rheumatol Suppl.* 2004;119:9-11.
5. Faerber L, Drechsler S, Ladenburger S, et al. The neuronal 5-HT₃ receptor network after 20 years of research--evolving concepts in management of pain and inflammation. *Eur J Pharmacol.* 2007 Mar 29;560(1):1-8.
6. Martin KF, Hannon S, Phillips I, et al. Opposing roles for 5-HT_{1B} and 5-HT₃ receptors in the control of 5-HT release in rat hippocampus in vivo. *Br J Pharmacol.* 1992 May;106(1):139-42.
7. Maleki N, Nayebi AM, Garjani A. Effects of central and peripheral depletion of serotonergic system on carrageenan-induced paw oedema. *Int Immunopharmacol.* 2005 Nov;5(12):1723-30.
8. Conner ThJ, Kelly JP, Leonard BE. An assessment of the acute effects of the serotonin releasers methylenedioxymethamphetamine, methylenedioxyamphetamine and fenfluramine on immunity in rats. *Immunopharmacology* 2000;46:223– 35.
9. Daher JB, de Melo MD, Tonussi CR. Evidence for a spinal serotonergic control of the peripheral inflammation in the rat. *Life Sci.* 2005 Apr 1;76(20):2349-59.
10. Khan NA, Poisson JP. 5-HT₃ receptor-channels coupled with Na⁺ influx in human T cells: role in T cell activation. *J Neuroimmunol* 1999;99(1):53–60.
11. Bardin L, Lavarenne J, Eschalier A. Serotonin receptor subtypes involved in the spinal antinociceptive effect of 5-HT in rats. *Pain.* 2000 May;86(1-2):11-8.
12. Huang J, Wang YY, Wang W, et al. 5-HT(3A) receptor subunit is expressed in a subpopulation of GABAergic and enkephalinergic neurons in the mouse dorsal spinal cord. *Neurosci Lett.* 2008 Aug 15;441(1):1-6