

Б. С. Сушко, А. В. Будақ

Особливості больової реакції та чутливості у тварин різних генетичних груп

Проведено експериментальное исследование развития болевого синдрома у мышей двух генетических линий 57BL/6J и CBA/CaLas в опытах с формалиновым тестом. Показано влияние ноцицептивного стимула на болевую поведенческую реакцию животных в болевом пороге на электрический стимул между этими группами животных. Ноцицептивный стимул приводит к уменьшению двигательных проявлений в поведении животных и увеличению времени пассивного состояния. Линия мышей 57BL/6J характеризует более высокими значениями интенсивности болевой реакции на фоне сниженной болевой чувствительности к электрическому стимулу. Животные линии 57BL/6J были более подвижны, чем животные линии CBA/CaLas. Такой характер поведения животных линии C57BL/6J указывает на повышенную видовую реактивность их нервной системы. Животные таких линий могут служить моделью для изучения клеточных механизмов развития соматической боли и поиска эффективных гипоанальгетических средств.

ВСТУП

Використання методів дослідження болю, які поширені при введенні гіпоанальгетичних засобів, різного роду паталогій і нейропатій, часто не враховують індивідуальних особливостей організму або обмежуються лише визначенням больового порогу [7–11]. Вивчення такого суб'єктивного емоційного відчуття, як біль на основі генетичних особливостей організму має деякі переваги. З точки зору загальної біології фенотипічний прояв комплексу специфічних реакцій на ноцицептивний стимул генетично детермінований. Завдячуючи успіхам генетиків, виведення інбредних ліній лабораторних тварин створило умови для переходу біомедичних досліджень на якісно новий рівень. Розбіжності у больовій чутливості та поведінці таких тварин на ноцицептивний стимул є передумовою розробки нових анальгетичних засобів. З методичної точки зору, всі дослідні тварини в межах однієї лінії гомозиготні та

генетично однорідні, що зумовлює краще відтворення результатів.

Метою нашого дослідження було встановити розбіжності у розвитку больового синдрому для мишей двох генетичних ліній C57BL/6J і CBA/CaLas, оцінити і визначити вплив больової чутливості тварин на розвиток болю, показати які зміни поведінки найбільш оптимально можуть бути використані для аналізу больового синдрому.

МЕТОДИКА

Експерименти проводили на самцях двох різних генетичних ліній статевозрілих мишей – C57BL/6J і CBA/CaLas з чорним і сірим забарвленням шерсті відповідно. Ці інбредні сублінії тварин виведено з двох віддалених колоній мишей Lathrop stock і Little [2]. Для дослідження тонічного больового синдрому використовували формаліновий тест (20 мкл 5%-го розчину формаліну під шкіру ступні задньої кінцівки). У цих експериментах реєстрували час

визування твариною осередку болю (поведінкова больова реакція – БРП), час рухових та пасивних проявів поведінки [5]. Інтенсивність того чи іншого прояву оцінювали як його сумарний час за певний інтервал.

В окремій серії дослідів було використано білих аутбредних мишей. У них також визначали характер змін поведінкових проявів на формалін. Контрольним тваринам цієї серії замість формаліну вводили 20 мкл 0,9%-го розчину NaCl.

Тварин різних груп досліджували в першій половині дня, в рандомізованій послідовності, протягом однієї-двох годин. Больовий поріг тварин досліджували за допомогою пристрою, який являв собою камеру з органічного скла розмірами 20X15X20 см, підлога якої була виготовлена з мідного дроту діаметром 1,5 мм. На лапи тварин, які знаходилися на такій підлозі, зі спеціально керованого комп'ютером пристрою подавали зростаючу електричну напругу зі швидкістю 10 В/с. Кожну мишу брали в дослід лише один раз. Кожній тварині пред'являли по три випробування: перше – через 3 хв після вміщення в дослідну камеру, наступні – через 2 хв одне за одним. Реєстрували напругу, яка викликала больову реакцію (вокалізацію або підскок тварини), в ту ж мить її вимикали. Ступінь розбіжності отриманих результатів оцінювали за допомогою статистичного алгоритму Стьюдента (Independent-Samples T-test) і дисперсійним аналізом за критерієм Фішера (One-Way ANOVA) програмним пакетом «SPSS 11». Розбіжності вважали вірогідними при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Слід зазначити, що між тваринами двох вибраних генетичних ліній спостерігалися суттєві відмінності поведінки на такий ноцицептивний стимул,

як формалін. Тварини лінії C57BL/6J були більш рухливі, ніж тварини лінії CBA/CaLac. Інтенсивність больової реакції у них була вищою протягом усього часу спостережень. На рис. 1 зображено часову динаміку БРП мишей цих двох ліній на введення 5%-го розчину формаліну ($n=30$ у кожній групі). Характер поступового зменшення БРП був різний для кожної лінії тварин. Якщо у тварин лінії C57BL/6J інтенсивність БРП знижувалася за годину спостережень приблизно вдвічі, то у тварин лінії CBA/CaLac – таке зниження сягало п'ятикратної відмінності. Сумарний час БРП за годину спостережень у тварин генетичної лінії C57BL/6J був на 73% більший, ніж у тварин лінії CBA/CaLac (відношення дисперсій становило $K_F=3.90$, що за дисперсійним критерієм Фішера відповідає $P < 0,001$). Серед інших проявів поведінки порівнювалися рухова активність тварин та тривалість сну. Рухова активність оцінювалася за сумою часу переміщень тварин по клітці та часу, затраченого твариною на їжу і грумінг (вмивання, вилузування непошкоджених частин тіла). Час сну тварин

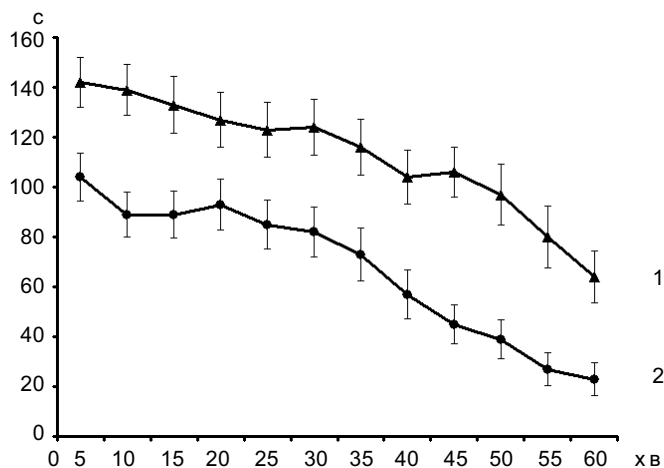


Рис. 1. Динаміка больової реакції поведінки на введення 5%-го розчину формаліну у мишей ліній C57BL/6J (1) і CBA/CaLac (2). За віссю ординат – тривалість вилузування твариною ураженої кінцівки за послідовні 5-хвилинні інтервали; за віссю абсцис – час спостережень

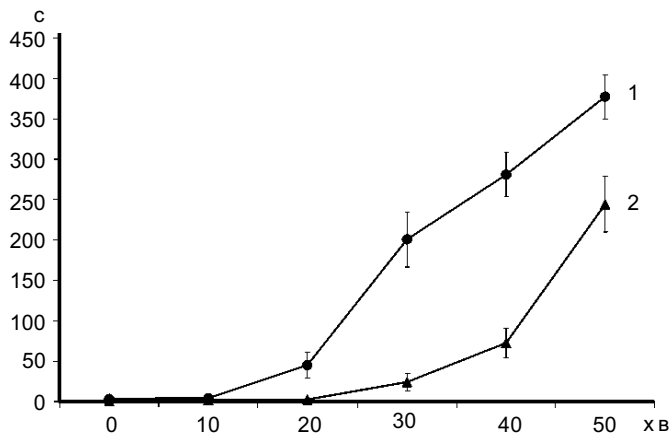


Рис. 2. Часові залежності сну двох ліній мишей СВА/СаЛас (1) і С57ВL/6J (2) після введення тваринам 5%-го розчину формаліну. За вісью ординат – середні значення часу прояву за послідовні 10-хвилинні інтервали; за вісью абсцис – час спостережень

відліковувався від моменту, коли тварина сиділа нерухомо з заплученими очима впродовж 30 с. Показано, що тварини лінії С57ВL/6J порівняно з мишами лінії СВА/СаЛас більше часу рухалися саме в середині періоду спостережень (з 15-ї по 35-ту хвилину): 175 ± 37 щодо $76 \text{ с} \pm 12 \text{ с}$ ($K_F=9,84$; $P<0,001$). Тривалість сну тварин лінії СВА/СаЛас, навпаки, була вищою ($912 \text{ с} \pm 74 \text{ с}$), ніж у мишей лінії С57ВL/6J ($346 \text{ с} \pm 54 \text{ с}$) за годину спостережень ($K_F=1,98$; $P<0,05$). Тварини лінії СВА/СаЛас починали засинати приблизно через 20 хв, а лінії С57ВL/6J – 40 хв після початку дослідження (рис. 2).

Показано наявність розбіжностей у больовому порозі для двох вибраних генетичних ліній тварин у дослідженнях з електричним стимулом. Такі розбіжності виявлено у тварин різних генетичних ліній, і між трьома послідовними випробуваннями у кожній лінії. Для тварин лінії С57ВL/6J середня напруга у всіх випробуваннях ($n=36$), яка викликала больову реакцію, становила $50,0 \text{ В} \pm 1,49 \text{ В}$, для тварин лінії СВА/СаЛас – $44,9 \text{ В} \pm 1,42 \text{ В}$ ($K_F=1,9$; $P<0,05$). У кожному наступному випробуванні величина електричного стимулу змен-

шувалася приблизно однаково для обох генетичних ліній: другому – на 5%, третьому – на 14% відносно першого стимулу (рис. 3).

У серії дослідів з аутбредними білими мишами визначено характер змін поведінкових проявів тварин на формаліновий тест протягом 2 год (рис. 4). У цих дослідженнях поведінкові прояви тварин після введення формаліну порівнювалися з контрольними тваринами. Введений тваринам формалін призводив до вилизування травмованої формаліном кінцівки, час якої вибрано за БРП. При цьому відбувалася істотна зміна інших проявів поведінки тварин як рухових, так і пасивних. У контролі за годину спостережень тривалість рухових проявів поведінки (переміщення, вмивання, приймання їжі) перевищувала час пасивного стану тварин (нерухомість, сон) майже в три рази. Після введення тваринам формаліну час пасивного стану, навпаки, втричі перевищував час рухових проявів (не враховуючи тривалість больової реакції). Таким чином, ноцицептивний стимул призводив до домінування пасивного стану серед інших проявів поведінки тварин. Час пасивного стану перевищував час усіх

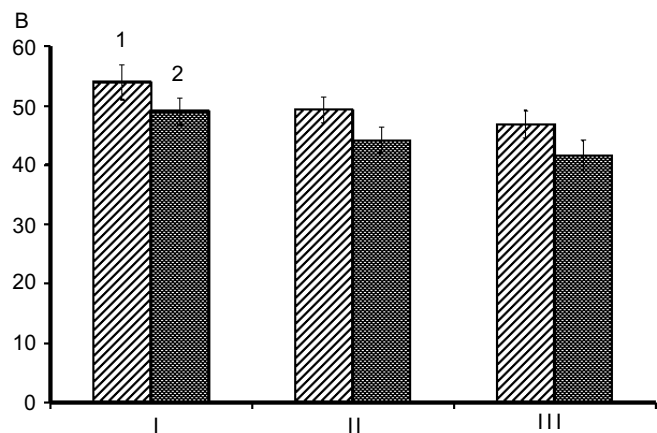


Рис. 3. Динаміка електричної напруги, що викликає больову реакцію у мишей ліній С57ВL/6J (1) і СВА/СаЛас (2) при трьох послідовних випробуваннях: (I–III) через 3, 5 і 7 хв

проявів поведінки тварин разом взятих, включаючи БРП, на 40%. Часові зміни інтенсивності кожного прояву поведінки тварин з осередком болю істотно відрізнялися від контролю. У контрольних мишей інтенсивність рухової активності лише через годину починала знижуватися. У тварин з ноцицептивним стимулом (формалін) рухова активність (як і больова реакція) набувала максимального значення тільки на початку спостережень і швидко зменшувалася, сягаючи нульових значень через 30 хв, частково відновлювалася через 100 хв. У контролі інтенсивність сну поступово підвищувалася, набуваючи максимальних значень через 100–120 хв. Для дослідних тварин часова залежність інтенсивності сну мала чіткий максимум на 70-й хвилині, майже в середині 120-хвилинного проміжку спостережень.

Результати досліджень із інбредними мишами показали, що введення формаліну призводить до суттєвих змін у поведінці тварин, зменшується їх рухова активність, збільшується час пасивного стану. Ноцицептивне збудження викликає розвиток процесів, кінцевим ефектом яких є гальмування – послаблення збудження. Таким чином, підтверджується відоме твердження, що гальмування – особливий активний

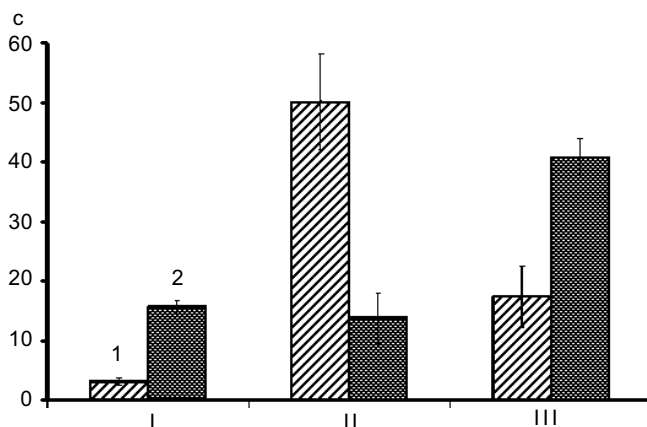


Рис. 4. Зміна проявів поведінки на формалін для аутбредних білих мишей за 60 хв спостережень: 1 – контроль, 2 – формалін; I – час вилизування твариною травмованої кінцівки; II – час рухових проявів поведінки; III – час пасивного стану

процес у нервовій системі, викликаний збудженням [4]. Проявом поведінки тварин, який у наших дослідах найбільш відчутно змінювався на початку спостережень, було вилизування твариною осередку болю (час його у дослідних тварини у 5 разів вищий за контроль). Отже, вибір часу вилизування твариною осередку болю є найбільш оптимальним щодо оцінки його інтенсивності. Слід зауважити, що істотне зниження БРП у тварин протягом 20–30 хв не означає відсутності больового синдрому, подовження якого визначається часом пасивного стану тварин. Інші прояви поведінки, різні види рухової активності (крім больової), пасивні стани та їх співвідношення також можуть використовуватися для аналізу больового синдрому як допоміжні показники.

Порівнюючи розбіжності значень у БРП для двох генетичних ліній мишей, слід відзначити наявність високого рівня значущості ($P < 0,001$). Такі відмінності свідчать про істотну різницю у сприйманні ноцицептивного стимулу тваринами ліній C57BL/6J і CBA/CaLac. Відомо, що для людини та тварин існує різна індивідуальна чутливість до стресу [3, 6]. Згідно з сучасними уявленнями, локомоторна активність є генетично запрограмованою видовою ознакою [1]. Отримані результати свідчать про наявність індивідуальних особливостей розвитку БРП у досліджуваних ліній тварин, які ґрунтуються на їх генетичних відмінностях. Щодо іншої рухової активності тварин, то після утворення осередку болю вона теж залишалася вищою у тварин лінії C57BL/6J. Час пасивного стану, включаючи сон тварин, був нижчим у тварин цієї лінії.

Результати, отримані в дослідах з електричною напругою вказують на те, що больовий поріг тварин лінії C57BL/6J вищий ніж у мишей лінії C57BL/6J. Тобто, ці тварини менш

чутливіші до електричного стимулу. Таким чином, розвиток больового синдрому у тварин генетичної лінії C57BL/6J відбувається з підвищенням рівнем БРП на фоні зниженої чутливості.

ВИСНОВКИ

1. Ноцицептивний стимул (формаліновий тест) призводить до суттєвого зниження рухових проявів поведінки тварин і збільшення часу перебування їх у пасивному стані.

2. Розвиток больового синдрому у тварин генетичної лінії C57BL/6J відбувається з підвищенням рівнем БРП на фоні зниженої чутливості до ноцицептивного стимулу відносно тварин лінії CBA/CaLac. Інтенсивний розвиток больового синдрому не обов'язково супроводжується підвищеною чутливістю до ноцицептивного стимулу.

3. Інтенсивніша соматична больова реакція у тварин генетичної лінії C57BL/6J може вказувати на більшу реактивність нервової системи цих тварин відносно тварин лінії CBA/CaLac. Дослідження клітинних механізмів, які лежать в основі функціонування нервової системи генетичних ліній тварин, надалі допоможуть при вивченні розвитку соматичного болю та пошуку ефективних індивідуальних гіпоанальгетичних заходів.

B. S. Sushko, A. V. Budak

FEATURES OF SOMATIC PAINFUL REACTION AND PAINFUL SENSITIVITY OF THE ANIMALS IN DIFFERENT GENETIC GROUPS

The development of a painful syndrome in two genetic lines of mice 57BL/6J and CBA/CaLac was investigated in experiments with the formalin test. It has been shown the influence of nociceptive stimulus on behaviour of animals, the presence of essential distinctions in painful behavioural reaction and other behavioural states, the difference in a painful threshold on electric stimulus between these both groups of animals. The nociceptive stimulus results in reduction of behaviour mobility states of animals and

Ін-т фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ

increases the passive behaviour states. The genetic line of mice 57BL/6J has shown higher values of intensity of painful reaction at the lower background painful sensitivity to electric stimulus, animal lines 57BL/6J were more mobile than animal lines CBA/CaLac. Such character of animal behaviour in lines C57BL/6J suggests the increased reactivity of nervous system of these animals, it may serve as a model for studying the cellular mechanisms of development of somatic pain for finding effective hypoanalgetic steps.

*A.A. Bogomoletz Institute of Physiology
National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev*

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Аршавский И. А. Физиологические механизмы и закономерности индивидуального развития. – М.: Наука, 1982. – 268 с.
2. Бландова З. К., Душкин В. А., Малащенко А. М. и др. Линии лабораторных животных для медико-биологических исследований. – М.: Наука, 1983. – 192 с.
3. Коплик Е. В. Метод определения критерия устойчивости крыс к эмоциональному стрессу // Вестник новых мед. технологий. – 2002. – **9**, № 1. – С. 16–18.
4. Костюк П. Г. Физиология центральной нервной системы. – К.: Вища школа, 1971. – 292 с.
5. Сушко Б. С., Лиманский Ю. П. Участие оксида азота в болевой поведенческой реакции у мышей с тонической болью // Нейрофизиология/Neurophysiology. – 2002. – **33**, № 5. – С. 357–365.
6. Юматов Е. А., Мещеряков О. Л. Прогнозирование устойчивости к эмоциональному стрессу на основе индивидуального тестирования поведения // Журн. высш. нер. деятельности. – 1990. – **40**, № 3. – С. 575.
7. Brignola G., Calignano A., Di Rosa M. Modulation of morphine antinociception in the mouse by endogenous nitric oxide // Brit. J. Pharmacol. – 1994. – **113**, № 4. – P. 1372–1376.
8. Jasmin L., Kohan L., Franssen M. et al. The cold plate as a test of nociceptive behaviours: description and application to the study of chronic neuropathic pain models // Pain. – 1998. – **75**, № 2–3. – P. 367–382.
9. Siegfried M. Biochemical pathogenesis of myofascial pain // J. Musculoskelet. – 1996. – **4**, № 1–2. – P. 145–162.
10. Saddy G.-M., Abboot F. V. The formalin test in the mouse: a parametric analysis of scoring properties // Pain. – 2000. – **89**, № 1. – P. 53–63.
11. Vatine J.-J., Ratner A., Rosen D., Seltzer Z. Differential sensory-motor effects of pentobarbital in intact rats genetically selected for high vs. low neuropathic pain-related behaviour // Ibid. – 1998. – **75**, № 2–3. – P. 295–303.

Матеріал надійшов до редакції 17.02.2004