

Ю.П. Лиманський, З.А. Тамарова, Л.І. Лиманська, О.І. Костюк, В.А. Мітрузаєва

Чутливість до тонічного болю й анальгін у двох ліній мишей з порушенням генотипом

У мишей с порушеним генотипом (лінії C57BL/6L и CBA/CaLac) и контрольных животных проведено сравнительное исследование поведенческих реакций (лизание лапки, сон, еда, бег, умывание) в норме, после подкожной инъекции 5%-го раствора формалина, а также в случае, когда животные перед инъекцией формалина получали анальгин. Установлено, что линейные мыши в норме (без каких либо воздействий) статистически достоверно отличаются по поведению от мышей без специфических нарушений генотипа. Это отличие состоит в том, что продолжительность сна у них в 3–4 раза, а еды – 5–13 раз меньше, чем у контрольных животных, зато умывание (груминг) интенсивнее в 2,4 раза. У мышей с генетическими нарушениями длительность болевой реакции на инъекцию формалина была в 1,3–2,4 раза меньше, чем у мышей контрольной группы. Анальгин в дозе 8,3 мг/кг у мышей с генетическими нарушениями подавлял боль слабее по сравнению с мышами контрольной группы, в которой анальгезия составляла 74,1 %, а у мышей с генетическими нарушениями – 27,6 и 28,9 %. Полученные результаты позволяют заключить, что мыши линии C57BL/6J и CBA/CaLac отличаются от животных без специфических нарушений генотипа как по исходному поведению, так и по реакции на тоническую боль. Анальгин оказывает на них менее выраженное анальгетическое действие по сравнению с животными контрольной группы.

ВСТУП

Техніка незворотного руйнування генів дозволяє одержати лінії мишей з селективним ушкодженням конкретного гена і, таким чином, з відсутністю в організмі тварини відповідного специфічного білка. Наявність ліній мишей без специфічних генів відкриває широкі можливості для вивчення генетичної регуляції больової поведінки, а також її рефлекторних компонентів.

Позитивним у техніці руйнування генів є можливість моделювання певних типів спадкової невропатології. Наприклад, відомо що такі клінічні симптоми, як спадкова розумова недостатність і агресивність зумовлені точковою мутацією структурного гена моноаміноксидази-А (одного з основних ферментів катаболізму моноамінів

мозку), локалізованого в Х-хромосомі [5]. Нещодавно була одержана лінія трансгенних мишей з незворотно зруйнованим геном моноаміноксидази-А та змінами вмісту серотоніну, дофаміну та норадреналіну, що супроводжувалося високою агресивністю, подібною до такої чоловіків з точковою мутацією цього гена [6]. Виведення таких тварин може бути використовано для розробки нових методів лікування.

Нині створено багато ліній мишей, які не мають генів, що контролюють певні типи поведінки. Існують, хоч і мало, дослідження, пов'язані з генетичним контролем больової чутливості, а також з метаболізмом і рецепцією медіаторів і модуляторів у ноцицептивних системах мозку. Так, у дослідах на мишах з генетичною відсутністю різних типів опіоїдних рецепторів

показано, що незворотне руйнування генів мю-рецепторів суттєво не змінювало больову чутливість, однак різко послаблювало ефект анальгезії [11, 18]. Відомо, що велику роль у регуляції деяких фізіологічних функцій, у тому числі і больової поведінки, відіграють медіатори серотонін, норадреналін і дофамін, дія яких реалізується через певні рецептори [9, 15, 17, 21]. Модель з вибірковою виключенням генів виявила роль дофамінового транспортера як одного з ланцюгів контролю вмісту дофаміну [7]. Створено лінію мишей C57BL/6J із значним дефіцитом генів, який є причиною суттєвих порушень багатьох ознак ноцицепції, гіперальгезії і анальгезії [10].

Мета цього дослідження – порівняльне вивчення особливостей больової та противбольової систем у мишей з генетичною схильністю до розвитку пухлин (лінії C57BL/6J, CBA/CaLac) та мишей без специфічних порушень генотипу.

МЕТОДИКА

Дослідження виконані на 60 дорослих мишах-самцях. З них 40 – тварини з порушеним генотипом (лінії C57BL/6J і CBA/CaLac) і 20 – білі лабораторні миші без специфічних генетичних порушень (контрольна група). У лінійних і контрольних мишей проведено порівняльне дослідження поведінкових реакцій: 1 – в нормі (без будь-яких впливів); 2 – після створення осередку тонічного болю (формаліновий тест); 3 – після створення осередку хомогенного болю на фоні ін'єкції анальгін.

Тварин розподілили на 6 груп по 10 у кожній. Осередок тонічного болю в усіх мишей створювали підшкірною ін'єкцією 5%-го розчину формаліну (30 мкл) у тильну поверхню стопи лівої задньої кінцівки. Після цього кожну мишу повертали у свою клітку та реєстрували протягом 60 хв початок і кінець кожного циклу поведінкових реакцій:

больової (вилизування ураженої кінцівки) і невольових (умивання, сон, приймання їжі, біг). Три групи тварин (дві лінійні групи і одна контрольна) зразу після ін'єкції формаліну одержали внутрішньоочеревинно розчин анальгін у дозі 8,3 мг/кг. Три інші групи (дві лінійні групи і одна контрольна) замість анальгін одержали 0,9%-й розчин NaCl. Як і в попередній серії, в усіх тварин реєстрували тривалість кожного циклу названих вище п'яти поведінкових реакцій.

За допомогою комп'ютерної програми підраховували тривалість больової і невольових поведінкових реакцій за кожні послідовні 10 хв і за весь період спостереження (60 хв). Результати обробляли статистично з визначенням середнього значення і квадратичної помилки середнього. Достовірність різниці між групами визначалась за критерієм t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ

Поведінка лінійних і контрольних мишей у нормі. Спостереження за мишами ліній C57BL/6J і CBA/CaLac показало, що їх поведінка істотно відрізняється від поведінки мишей контрольної групи. Аналіз п'яти поведінкових реакцій показав, що миші з генетичними порушеннями дуже мало сплять і їдять. Зате умивання (грумінг) у них було інтенсивнішим, ніж у мишей контрольної групи. За всіма показниками, крім бігу, різниця була статистично достовірною (табл. 1).

Поведінкові реакції мишей на тонічний біль (формаліновий тест). Ін'єкція формаліну в стопу задньої кінцівки викликала у мишей тривалу больову реакцію, ознакою якої було вилизування осередку болю. Як показано на рис. 1, а больова реакція на введення формаліну у мишей контрольної і дослідних груп істотно відрізнялася. Найменшою вона була у мишей лінії CBA/CaLac, середньою – у мишей лінії C57BL/6J, а найбільшою – у мишей контрольної

Таблиця 1. Тривалість (с) різних поведінкових реакцій у мишей контрольної групи і мишей ліній C57BL/6J і CBA/CaLac у нормі (M±m; n = 10)

Тип реакції	Контрольна група	Лінія C57BL/6J	Лінія CBA/CaLac
Вилузування лапки	7,8±2,9	37,3± 12,3*	43,6±17,2*
Сон	1227,5±354,6	299,2±155,9*	398,1±115,1*
Приймання їжі	771,5±232,8	153,3±51,7*	57,8±39,7**
	(10)	(10)	(8)
Умивання	324,1±52,5	781,4±71,1***	549±96*
Біг	316,2±102,4	276,8±57,2	200,8±94,4

Примітка. Тут і в табл. 2 у дужках указано кількість тварин у групі, які приймали їжу. *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001 порівняно з контролем.

групи. У кінці спостережень (60 хв) у мишей контрольної групи тривалість вилузування осередку болю залишалася на досить високому рівні, тоді як у лінійних мишей спостерігалось зниження інтенсивності вилузування.

У цілому за годину спостереження тривалість больової реакції у контрольних мишей була 942,1 с, у мишей лінії C57BL/6J – 724,7 с, лінії CBA/CaLac – 397,8 с. Небольові реакції після ін'єкції формаліну в різних групах також відрізнялися. Сумарну тривалість усіх реакцій наведено у табл. 2. Однаковим для всіх тварин було практично повна відсутність інтересу до їжі. В нормі тривалість приймання їжі у мишей конт-

рольної групи становила в середньому 771,5 с, у мишей лінії C57BL/6J – 153,3 с і у мишей лінії CBA/CaLac – 57,8 с. У перших двох групах харчувалися всі тварини, а в третій – 8 з 10. Після створення осередку тонічного болю в усіх трьох групах лише одна миша з 10 на короткий час доторкалася до корму, загальний час, витрачений на приймання їжі, становив усього 0,1–0,3 с. У всіх тварин істотно змінювалася тривалість сну, але, якщо у мишей контрольної групи після ін'єкції формаліну цей показник скорочувався, то у лінійних мишей – збільшувався.

Вплив анальгіну на формаліновий тест у лінійних і контрольних мишей. У тварин, яким зразу після ін'єкції формаліну вводили

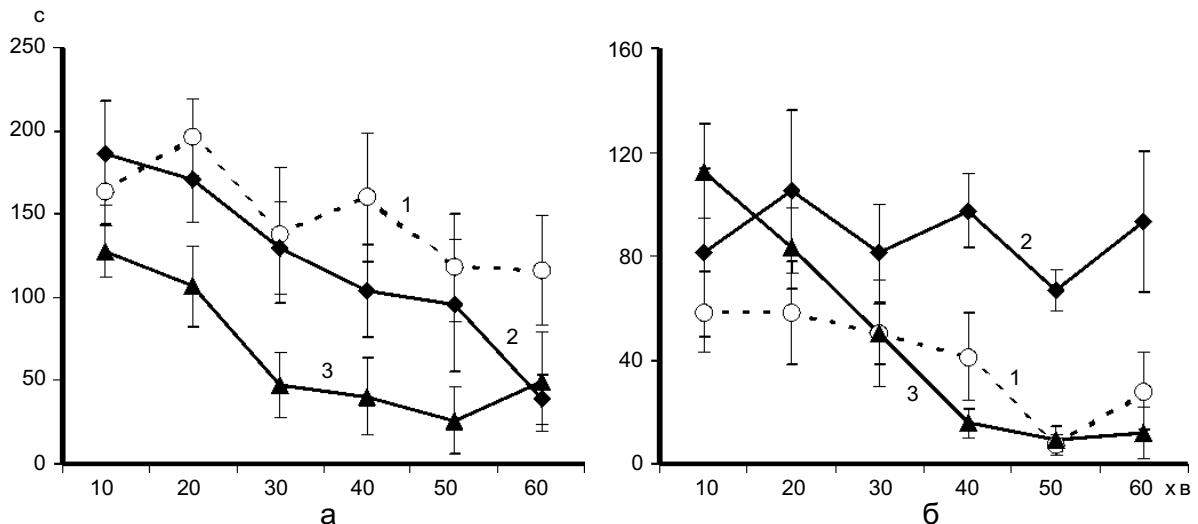


Рис. 1. Динаміка больової поведінкової реакції викликаній формаліном (а) та формаліном на фоні анальгіну (б) у мишей контрольної групи (1) та ліній C57BL/6J (2) і CBA/CaLac (3). За віссю ординат – тривалість вилузування ураженої кінцівки за послідовні 10 хв спостереження, за віссю абсцис – час спостереження

Таблиця 2. Тривалість (с) больової і не больової поведінкових реакцій на формаліновий тест у мишей до і після ін'єкції анальгін (M±m, n = 10)

Поведінкові реакції	Контрольна група		Лінія C57BL/6J		Лінія CBA/Ca Lac	
	Без анальгін	На фоні анальгін	Без анальгін	На фоні анальгін	Без анальгін	На фоні анальгін
Вилузування осередку болю	942,1±130,9 100%±13,9%	243,6±71,0*** 25,9%±7,5%	724,7±71,0 100%±9,8%	523,8±62,9* 72,4%±8,7%	397,8±93,9 100%±23,6%	283±44,9 71,1%±11,3%
Сон	557,3±130,6 100%±23,4%	1261,8±186,3** 226,4%±33,4%	560,8±63,4 100%±11,3%	308,7±67,2* 55%±12%	745,3±182,7 100%±24,5%	992,6±176,8 133,2%±23,7%
Приймання їжі	0,1±0,1 (1)	0 (0)	0,3±0,3 (1)	0,5±0,5 (1)	0,2±0,2 (1)	9,9±9,5 (2)
Умивання	139,4±29,9 100%±21,4%	146,0±82,8 104,7%±59,4%	76,3±15,7 100%±20,6%	92,5±15,3 121,2%±20%	82,7±18,2 100%±22%	59±9,6 71,3%±11,6%
Біг	92,4±26,9 100%±29,1%	34,1±10,0* 36,9%±10,8%	114±37,6 100%±33%	125,2±35,6 109,8%±31,2%	59,2±19,6 100%±33,1%	46,7±23,5 78,9%±39,7%

*P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001 достовірність різниці між значеннями в кожній групі до і після застосування анальгін.

анальгін, поведінкова реакція була слабкіша, ніж у тварин з формаліновим тестом, але які не отримували анальгін (рис. 1, б).

Сумарні значення тривалості больової поведінкової реакції за 60 хв спостереження (табл. 2) також значно відрізнялися у тварин різних груп. Всі миші одержували одну й ту саму дозу анальгін, але тривалість больової реакції у мишей лінії C57BL/6J становила 523,8 с, у мишей лінії CBA/CaLac – 283 с, а в контрольній групі – 243,6 с.

На рис. 2 показано, що больова реакція на формаліновий тест у трьох групах відрізнялася як до, так і після ін'єкції анальгін. Без анальгін її тривалість була найбільшою у тварин контрольної групи, а найменшою – у мишей лінії CBA/CaLac. На фоні анальгін тривалість вилузування осередку болю виявилася найбільшою у мишей лінії C57BL/6J і найменшою у тварин контрольної групи.

На фоні анальгін у мишей лінії C57BL/6J час вилузування осередку болю був удвічі більшим, ніж у тварин контрольної групи. З іншого боку, тривалість сну у них була меншою в 4 рази. Тварини були неспокійні (в 4 рази більше часу бігали). У мишей лінії CBA/CaLac на фоні анальгін загальний час вилузування осередку болю

був приблизно таким самим, як у тварин контрольної групи. Однак, враховуючи різницю між вихідними значеннями больової реакції, це не означає, що знеболювальний ефект анальгін у них однаковий.

Для того, щоб порівняти ефективність протибольової дії анальгін у тварин різних груп, ми прийняли тривалість вилузування осередку болю в кожній групі до ін'єкції

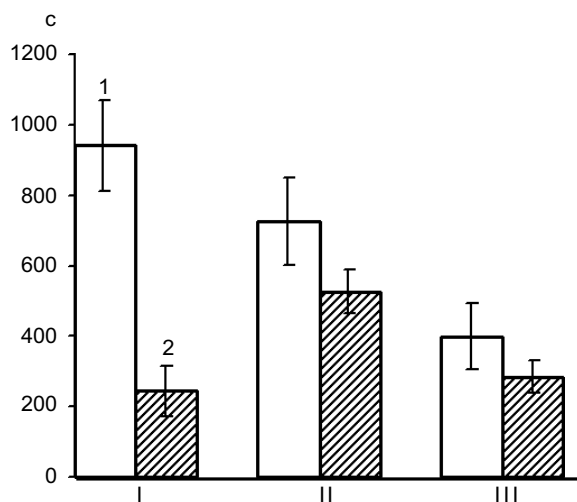


Рис. 2. Загальна тривалість больової поведінкової реакції у мишей контрольної групи (I), лінії C57BL/6J (II) і CBA/CaLac (III) до ін'єкції анальгін (1) і після (2). За віссю ординат – тривалість вилузування ураженої кінцівки за 60 хв спостереження

анальгін у за 100 %. Реакція на фоні анальгін у оцінювалася у відсотках від вихідної у своїй групі (див. табл.2; рис. 3).

Виявилася, що анальгін викликає найбільший знеболювальний ефект у мишей контрольної групи (74,1 %). Анальгезія становила всього 27,6 і 28,9 % у групах мишей ліній C57BL/6J і CBA/CaLac відповідно (див. рис. 3).

ОБГОВОРЕННЯ

Нині для дослідження болю все більше використовують тварин з порушеним генотипом. Згідно з нашими спостереженнями поведінка мишей з порушеним генотипом (ліній C57BL/6J і CBA/CaLac) навіть без будь-яких впливів суттєво відрізняється від поведінки тварин контрольної групи. За всіма поведінковими реакціями, крім бігу, різниця виявилася статистично достовірною. Найбільш характерним було те, що миші з генетичними порушеннями в нормі дуже мало спали і їли. Зате умивання у них було інтенсивнішим, ніж у мишей контрольної групи. Так, у мишей ліній C57BL/6J тривалість сну була в 4 рази, а приймання їжі в 5 разів меншими, тоді як умивання у них займало в 2,4 рази більше часу, ніж у контрольних мишей. У

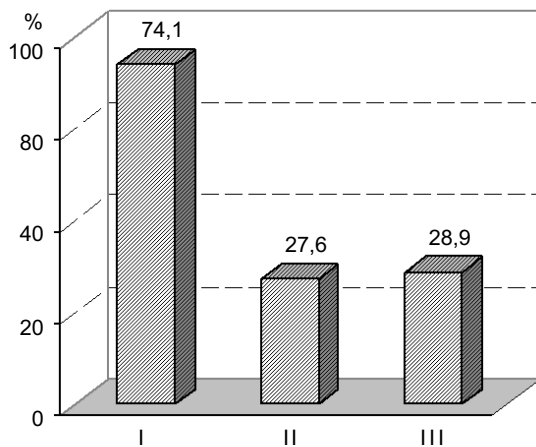


Рис. 3. Протибольова дія анальгін у мишей контрольної групи (I), ліній C57BL/6J (II) і CBA/CaLac (III). За вісью ординат – анальгетичний ефект

цілому миші ліній C57BL/6J відрізнялися підвищеною збудливістю й агресивністю. Виявлено також [12], що миші цієї лінії більш чутливі до морфін у. У мишей ліній CBA/CaLac тривалість сну була в 3 рази, а їжі в 13 разів меншою, ніж у контрольних тварин. Але ці миші, як і миші контрольної групи, не були агресивними, що збігається з літературними даними [1, 2].

Установлено, що для мишей ліній C57BL/6J характерний знижений вміст моноамінів у мозку. Відомо, що моноаміни серотонін, надреналін і дофамін беруть участь у регуляції больової поведінки [9, 15, 17, 21]. Зниження вмісту цих речовин у мозку може бути однією з причин агресивної поведінки мишей даної лінії.

Больова поведінкова реакція на формаліновий тест у мишей з генетичними порушеннями була такою самою, як і у тварин контрольної групи: тварини переставали їсти і більшу частину часу були зайняті вилізанням осередку болю. Однак тривалість больової реакції у цих мишей була в 1,3 рази (лінія C57BL/6J), а то і в 2,4 рази (лінія CBA/CaLac) меншою, ніж у контрольних тварин. Це спостерігали й інші автори [1, 2]. У контрольних мишей після створення осередку тонічного болю час сну різко зменшувався, а у мишей з генетичними порушеннями – збільшувався (порівняно з нормою в своїй групі). Показано [13], що миші ліній C57BL/6J виявляють високу чутливість до хемогенного болю (формаліновий тест), однак такої інформації про мишей ліній CBA/CaLac у літературі немає. Встановлено, що у мишей ліній C57BL/6J локуси якісних ознак (QTL) хромосомних ділянок для хемогенного болю (формаліновий тест) локалізуються у дистальних хромосомах 9 і 10 [20], тоді як для термічного болю – в хромосомі 4 [13, 14].

Анальгетичний ефект анальгін у мишей ліній CBA/CaLac і C57BL/6J був слабшим (27,6 і 28,9 %), ніж у контролі (74,1 %).

Це вказує на те, що у мишей ліній C57BL/6J і CBA/CaLac істотно змінена здатність ноцицептивних і антиноцицептивних систем реагувати на анальгетики.

Як показують дані літератури, використаний у нашому дослідженні анальгетик ненаркотичного ряду – анальгін, взаємодіє з нейронами протибольових систем стовбура мозку. Він може прямо активізувати ендогенну опіоїдну систему [8], потенціювати дію ендогенних опіоїдів [19], а також блокувати периферичну дію альгетиків [3, 4].

Аналіз зміни невольових поведінкових реакцій на формаліновий тест у лінійних мишей до та після ін'єкції анальгін (див. табл. 2) показав, що загальна тривалість моторної активності (біг, умивання) у мишей лінії C57BL/6J збільшувалася приблизно на 10–20 %, тоді як у мишей лінії CBA/CaLac – зменшувалася на 20–30 % від вихідного значення. Водночас у мишей контрольної групи під впливом анальгін спостерігалось збільшення тривалості умивання і зменшення бігу. В цьому відношенні наші результати дещо відрізняються від спостережень інших авторів [16].

Y.P. Limansky, Z.A. Tamarova, L.I. Limanskaja, O.I. Kostyuk, V.A. Mitruzaeva

SENSITIVITY TO TONIC PAIN AND ANALGIN IN TWO LINES OF MICE WITH A GENETIC KNOCKOUT

A comparative study of behavioral reactions (licking of back paw, sleeping, eating, running, washing) in mice with a genetic knockout (lines C57BL/6L and CBA/CaLac) and in control animals was carried out. Experiments have been performed in control conditions (without any influences), after a subcutaneous injection of 5% formalin solution, and also in a case when animals before an injection of formalin received analgin. It was established that the behavior of mice with a genetic knockout without any influences statistically authentically differs from mice without genotype infringements. Sleep duration in mice with a genetic knockout was 3–4 times less, and duration of eating was 5–13 times less than in control animals, but grooming (washing) was more intensive (in 2,4 times). Duration of painful reaction (licking of back paw) in response

to formalin injection in mice with a genetic knockout was in 1,3–2,4 times less, than in mice of control group. Analgin in a dose of 8,3 mg/kg in genetic knockout mice suppressed pain more poorly, than in mice of control group. Analgesia in control group amounted 74,1%, and in genetic knockout mice it was 27,6–28,9%. The results allow concluding that mice with a genetic knockout differ from control animals both by initial behavior, and by reaction to a tonic pain. Analgin causes a weaker analgesic action in mice with a genetic knockout in comparison with animals of control group.

A.A. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Science of Ukraine, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Кудрявцева Н.Н., Ситников А.П. Влияние генотипа на формирование агрессивного и подчиненного поведения у мышей // Журн. высш. нерв. деятельности. – 1987. – 37. – С. 287–292.
2. Кудрявцева Н.Н., Ситников А.П. Влияние эмоциональности, исследовательской активности и болевой чувствительности на проявление антагонистического поведения у мышей // Там же. – 1986. – 36, №4. – С. 686–691.
3. Aguirre-Banuelos P., Granados-Soto V. Evidence for a peripheral mechanism of action for the potentiation of the antinociceptive effect of morphine by dipyrone // J. Pharmacol. Toxicol. Methods. – 1999. – 6, №2. – P. 79–85.
4. Aguirre-Banuelos P., Granados-Soto V. Peripheral antinociceptive interaction of dipyrone and morphine in the formalin test // Proc. West Pharmacol. Soc. – 2000. – 43. – P. 11–14.
5. Brunner H.G. Monoamine oxidase and behaviour // Ann. Med. – 1995. – 27, №4. – P. 431–432.
6. Cases O., Seif I., Grimsby J. et al. Aggressive behavior and altered amounts of brain serotonin and norepinephrine in mice lacking MAOA // Science. – 1995. – Jun 23. – 268(5218). – P. 1763–1766.
7. Giros B., Jaber M., Jones S.R. et al. Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter // Nature. – 1996. – Feb. 15. – 379(6566). – P. 606–612.
8. Hernandez N., Vanegas H. Antinociception induced by PAG-microinjected dipyrone (metamizol) in rats: involvement of spinal endogenous opioids // Brain Res. – 2001. – Mar. 30. – 896(1–2). – P. 175–178.
9. Kharkevich D.A., Churukanov V.V. Pharmacological regulation of descending cortical control of the nociceptive processing // Eur. J. Pharmacol. – 1999. – Jun. 3. – 375(1–3). – P. 121–131.
10. Lariviere W.R., Chesler E.J., Mogil J.S. Transgenic studies of pain and analgesia: mutation or background genotype? // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 2001. – May. – 297(2). – P. 467–473. Review.
11. Matthes H.W., Maldonado R., Simonin F. et al. Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-

- receptor gene // Nature. – 1996. – Oct 31. – **383**(6603). – P. 819–823.
12. Miner L.L., Elmer G.I., Pieper J.O., Marley R.J. Aggression modulates genetic influences on morphine analgesia as assessed using a classical mendelian cross analysis // Psychopharmacology (Berl.). – 1993. – **111**, № 1. – 17–22.
 13. Mogil J.S., Lichtensteiger C.A., Wilson S.G. The effect of genotype on sensitivity to inflammatory nociception: characterization of resistant (A/J) and sensitive (C57BL/6J) inbred mouse strains // Pain. – 1998. – May. – **76**(1–2). – P. 115–125.
 14. Mogil J.S., Richards S.P., O'Toole L.A. et al. Genetic sensitivity to hot-plate nociception in DBA/2J and C57BL/6J inbred mouse strains: possible sex-specific mediation by delta2-opioid receptors // Pain. – 1997. – **70**(2–3). – P. 267–277.
 15. Omote K., Kawamata T., Kawamata M., Namiki A. Formalin-induced nociception activates a monoaminergic descending inhibitory system // Brain Res. – 1998. – Dec. 14. – **814**(1–2). – P. 194–198.
 16. Saddi G., Abbott F.V. The formalin test in the mouse: a parametric analysis of scoring properties // Pain. – 2000. – Dec. 15. – **89**(1). – P. 53–63.
 17. Schreiber S., Getslev V., Weizman A., Pick C.G. The antinociceptive effect of moclobemide in mice is mediated by noradrenergic pathways // Neurosci Lett. – 1998. – Sep. 11. – **253**(3). – P. 183–186.
 18. Sora I., Takahashi N., Funada M. et al. Opiate receptor knockout mice define mu receptor roles in endogenous nociceptive responses and morphine-induced analgesia // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 1997. – Feb. 18. – **94**(4). – P. 1544–1549.
 19. Taylor J., Mellstrom B., Fernaud I., Naranjo J.R. Metamizol potentiates morphine effects on visceral pain and evoked c-Fos immunoreactivity in spinal cord // Eur. J. Pharmacol. – 1998. – Jun 12. – **351**(1). – P. 39–47.
 20. Wilson S.G., Chesler E.J., Hain H. et al. Identification of quantitative trait loci for chemical/inflammatory nociception in mice. – Pain. – 2002. – Apr. – **96**(3). – P. 385–391.
 21. 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). – P. 163–168.