

Б.С. Сушко

Вплив генетичного фактора та ноцицептивного стимулу на розвиток вісцерального болю

Проведено експериментальное исследование болевой поведенческой реакции на ноцицептивный висцеральный стимул с аутбредными белыми мышами и мышами генетических линий C57BL/6J и CBA/CaLac. Показано влияние внутрибрюшинного введения разных объёмов и концентраций раствора уксусной кислоты на висцеральную болевую поведенческую реакцию у аутбредных и животных генетических линий. Обнаружено, что у мышей линии CBA/CaLac проявляется более высокая интенсивность висцеральной болевой поведенческой реакции (на 32 %), чем у мышей линии C57BL/6J. Сравнение интенсивности поведенческих реакций на соматическую боль (формалиновый тест) показало, что у животных линии CBA/CaLac эта интенсивность на 48,5 % ниже, чем у животных линии C57BL/6J. Такие различия в характере поведенческой реакции на соматическую и висцеральную боль могут быть вызваны особенностями функциональной организации центральных структур мозга, участвующих в формировании ноцицептивных висцеральных и соматических рефлексов у животных этих двух генетических линий.

ВСТУП

Вісцеральний біль відрізняється від соматичного кількома важливими особливостями, його не так широко вивчають, в результаті чого наші знання про нейрофізіологічні механізми розвитку та клінічне проведення залишаються недостатніми [6, 8, 10, 11]. З загальнобіологічного погляду фенотипічний прояв комплексу специфічних реакцій на ноцицептивний стимул генетично детермінований [1–3, 12, 16, 17]. Тому використання тварин однієї лінії, які є гомозиготні та генетично однорідні, створює умови якісно нових досліджень. Аналіз розбіжностей у больовій чутливості та поведінці таких інбредних ліній тварин на вісцеральний ноцицептивний стимул дозволить краще зрозуміти механізми його розвитку та впровадити нові анальгетичні засоби.

Метою нашого дослідження було встановити розбіжності у розвитку вісцерального больового синдрому для двох генетичних ліній мишей C57BL/6J і CBA/CaLac,

визначити вплив інтенсивності ноцицептивного стимулу й оцінити відмінності реакцій цих тварин на вісцеральний і соматичний стимули.

МЕТОДИКА

Досліди проведено на самцях двох різних генетичних ліній статевозрілих мишей – C57BL/6J і CBA/CaLac, чорного та сірого забарвлення відповідно. Ці інбредні сублінії тварин виведено з двох віддалених колоній мишей Lathrop stock і Little [2]. Вісцеральний стимул викликали внутрішньоочеревинним введенням ізотонічного розчину оцтової кислоти. В окремих дослідах з білими аутбредними мишами вивчали дію розчину оцтової кислоти різної концентрації й об'єму. Було досліджено дію таких ізотонічних розчинів у концентрації: 0,55, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 та 1,9 %. Ізотонічні розчини оцтової кислоти готували на 0,9%-му водному розчині NaCl, враховуючи константу дисоціації цієї кислоти. В такий спосіб найбільша ізо-

© Б.С. Сушко

тонічна концентрація оцтової кислоти сягла 1,81 %. За спеціальною комп'ютерною програмою реєстрували тривалості різних проявів поведінки на вісцеральний стимул упродовж години. За інтенсивність вісцеральної больової реакції поведінки (БРПв) вибрано тривалість сукупності таких специфічних поведінкових рухових проявів, як здригання, вигинання та витягування тіла тварин (так звані вісцеральні корчі) за певний час спостережень у хвилинах [6]. Реєстрували інші допоміжні прояви поведінки: переміщення, вмивання, споживання їжі, сон. За тваринами спостерігали в окремі клітці, в однаковий час доби, у рандомізованій послідовності дослідних і контрольних. Кожну тварину використовували в досліді один раз, кількість тварин у кожній дослідній групі зазначена в результатах досліджень. Розбіжності між значеннями інтенсивностей поведінкових проявів оцінювали за статистичними критеріями Стюдента та Фішера, відмінності вважалися достовірними при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Серед різних прийомів створення експериментального вісцерального болю [9, 10] ми зупинилися на доступному і водночас надійному методі внутрішньоочеревинного введення дослідним тваринам розчину оцтової кислоти. Для вибору ноцицептивного стимулу були використані аутбредні білі миші. В досліді з цими тваринами визначалася залежність БРПв від інтенсивності вісцерального стимулу, зміна якої залежала від концентрації й об'єму оцтової кислоти. Відомо, що вісцеральний біль не локалізований, спостерігається відсутність залежності інтенсивності відчуття

від розмірів ушкодження тканини, формування адаптивної поведінки обмежується прийняттям «вимушеної» пози [7]. Під час наших експериментів з аутбредними мишами показано, що розвиток різних поведінкових проявів, у тому числі больових, залежав від інтенсивності стимулу та часу після його нанесення. Часовий характер змін БРПв для об'ємів оцтової кислоти в 0,3 мл і концентрацій 0,7 і 0,8 % був фазним. Максимальні значення БРПв для таких концентрацій спричинялися в середньому через 15 хв після введення розчину оцтової кислоти. Надалі, після досягнення максимуму, значення БРПв поступово зменшувалися (рис. 1, а). Для менших концентрацій (0,55, 0,6 %) зміни БРПв з часом були недостовірні. Залежність сумарних серед-

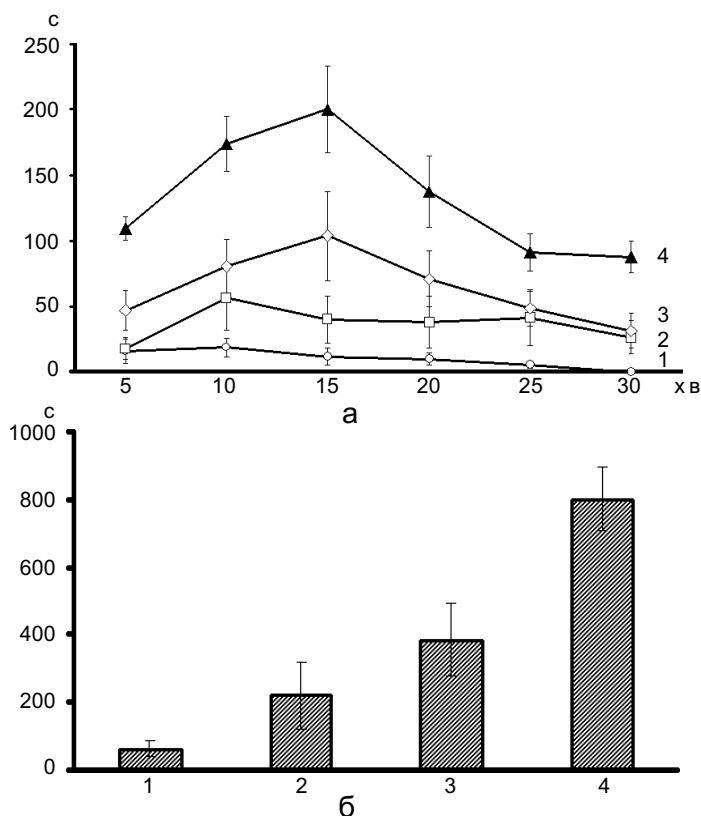


Рис. 1. Залежність інтенсивності вісцеральної больової реакції від часу спостережень та від концентрації розчину оцту (а): 1 – 0,55 %, 2 – 0,6 %, 3 – 0,7 %, 4 – 0,8 %. На б – сумарна інтенсивність вісцеральної больової реакції за 30 хв спостереження. Об'єм розчину оцту – 0,3 мл

ніх значень БРПв за весь час спостережень від концентрації оцтової кислоти показано на рис. 1,б. Достовірна розбіжність між середніми значеннями БРПв ($P < 0,05$, $n=6$) за весь час спостережень отримана лише для концентрації оцтової кислоти 0,8 % (див. рис. 1,б).

Проведено дослідження дії трьох концентрацій розчину оцтової кислоти (0,7, 0,9, 1,8 %) в об'ємі 0,15 мл на БРПв у різних групах таких аутбредних мишей. При зменшенні вдвічі об'єму оцтової кислоти (до 0,15 мл) час БРПв для аутбредних мишей також зменшувався. Так, порівняння сумарного часу БРПв між двома групами тварин, які отримували розчин оцтової кислоти в однаковій концентрації (0,7 %) і різних її об'ємах (0,15 і 0,3 мл) показало,

що час БРПв для об'єму 0,15 мл був на 42 % меншим. Тривалість БРПв за 30 хв спостережень для концентрації 0,7 % і об'ємів 0,15 і 0,3 мл становили $269,1 \pm 49,5$ ($n=22$) та $382 \text{ с} \pm 93 \text{ с}$ ($n=6$) відповідно; $P < 0,05$. Така тенденція змін залишалася і при дії більших концентрацій розчину оцтової кислоти різних об'ємів. За 30 хв спостережень час БРПв тварин, які отримували 0,9%-й розчин оцтової кислоти об'ємом 0,15 мл, виявився на 39 % нижчим від цього показника у тварин, яким вводили розчин об'ємом 0,3 мл і концентрацією 0,8 %, що становило $577,7 \pm 88,7$ ($n=11$) та $800 \text{ с} \pm 92 \text{ с}$ ($n=6$) відповідно ($P < 0,05$).

Для об'єму 0,15 мл максимальні значення інтенсивності БРПв для випробуваних концентрацій спостерігалися приблизно через 10 хв після початку дії оцтової кислоти. Збільшення концентрації також підвищувало й інтенсивність БРПв (рис. 2). Максимальні значення тривалості БРПв при дії 1,8%-го розчину оцтової кислоти були достовірно вищі за дію менших його концентрацій. На початку спостережень значення тривалості БРПв при дії 1,8 і 0,9%-го розчину оцтової кислоти становили $167,1 \pm 7,4$ ($n=43$) та $109,2 \text{ с} \pm 19,7 \text{ с}$ ($n=11$) відповідно ($P < 0,05$), тобто розбіжність була 53 %. Слід відзначити, що в цих дослідах сумарний час БРПв за годину спостережень і часовий характер змін БРПв для концентрацій 0,9 і 1,8 % достовірно не відрізнялися. Таким чином, концентрацію 0,9%-го розчину оцтової кислоти об'ємом 0,15 мл можна вважати найбільш оптимальною для створення експериментального вісцерального болю. Зменшення об'єму до 0,15 мл скоротило тривалість БРПв на початку спостережень, а збільшення концентрації до 0,9 %

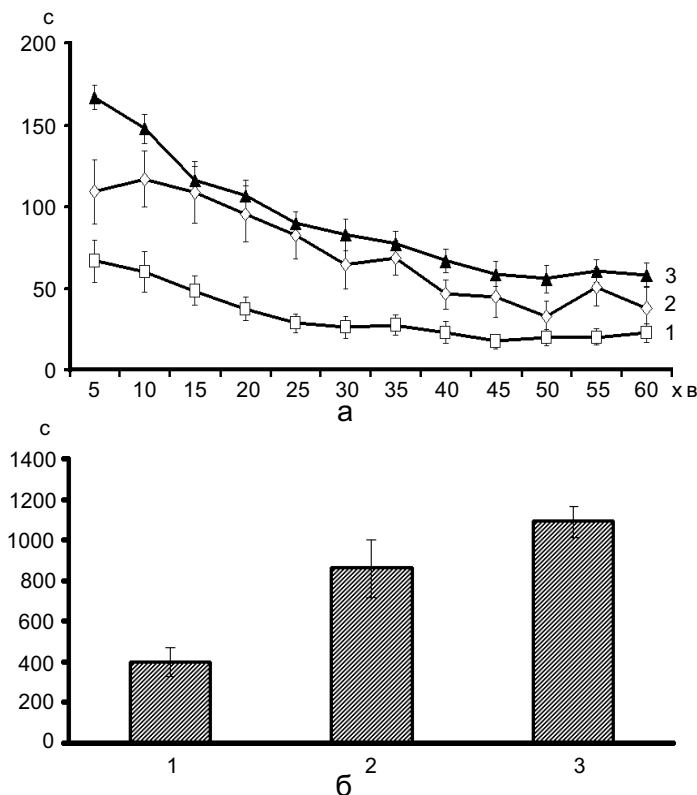


Рис. 2. Залежність інтенсивності вісцеральної больової реакції від часу спостережень та від концентрації розчину оцту (а): 1 – 0,7, 2 – 0,9, 3 – 1,8 %. На б – сумарна інтенсивність вісцеральної больової реакції за 60 хв спостереження. Об'єм розчину оцту – 0,15 мл

наблизило БРПв до оптимального рівня.

Саме таку концентрацію й об'єм оцтової кислоти було застосовано для порівняння БРПв у мишей двох різних генетичних ліній – C57BL/6J та CBA/CaLac. Результати досліджень показали, що тривалість БРПв у тварин генетичної лінії CBA/CaLac більша ніж у тварин лінії C57BL/6J. На рис. 3,а представлено часові зміни інтенсивності БРПв для цих двох генетичних ліній тварин після внутрішньоочеревинного введення їм 0,15 мл 0,9%-го розчину оцтової кислоти. За 60 хв спостережень тривалість БРПв у тварин CBA/CaLac була в середньому на $31,8\% \pm 6,0\%$ більшою ($1336,4 \pm 80,2$ щодо $1014,2 \text{ с} \pm 68,9$ с у тварин лінії C57BL/6J; $n=10$, $P<0,05$). Така розбіжність у сприйманні вісцерального стимулу тваринами двох різних генетичних ліній може свідчити про наявність у них індивідуальних особливостей розвитку БРПв, які ґрунтуються на генетичних відмінностях [1, 3, 6, 16]. Відомо, що миші лінії C57BL/6J і CBA/CaLac мають різний характер поведінки [4, 6]. Тварини лінії C57BL/6J характеризуються агресивністю, більш високою дослідницькою та моторною активністю, зниженою емоційністю. Під дією вісцерального стимулу зазнавали змін також і інші прояви поведінки. Так, тварини лінії CBA/CaLac набагато менше часу спали, ніж тварини лінії C57BL/6J, що також підтверджує більш інтенсивний розвиток вісцерального синдрому у тварин лінії CBA/CaLac. Якщо тварини лінії CBA/CaLac спали в середньому менше ніж 2 хв за годину спостережень, то тварини лінії C57BL/6J – майже 7 хв ($105,8 \pm 85,3$ та $400,9 \text{ с} \pm 172,4$ с відповідно, $n=10$, $P<0,05$). Що стосується таких рухових проявів поведінки, як переміщення та вмивання, то у тварин лінії CBA/CaLac час цих

проявів був достовірно вищим, ніж у тварин лінії C57BL/6J ($P<0,05$, $n=10$; рис. 4,а). Зважаючи на те, що локомоторна активність є генетично запрограмованою видовою ознакою, результати дослідів з вісцеральним болем могли б свідчити про більш високу рухову активність саме тварин генетичної лінії CBA/CaLac. Але однозначність такого висновку стає сумнівною, якщо порівняти поведінкові прояви цих самих тварин у досліді з формаліновим тестом [6]. При соматичному болю, що був викликаний введенням 0,25 мл 5%-го розчину формаліну в задню кінцівку дослідних тварин, розвиток больового синдрому у тварин лінії CBA/CaLac (вилузування осередку болю) відбувався менш інтенсивно, ніж у тварин лінії C57BL/6J і становив $567,3 \pm 62,7$ та $1100,6 \text{ с} \pm 124,7$ с відповідно, тобто розбіжність була $48,5\%$ ($n=10$; $P<0,05$). Тривалість сну у тварин лінії CBA/CaLac при соматич-

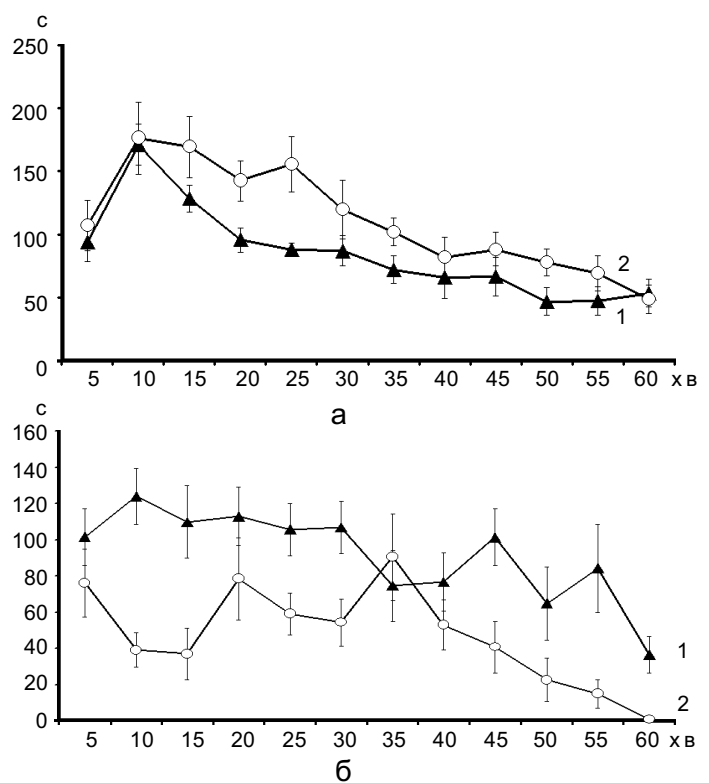


Рис. 3. Часові залежності змін больової реакції тварин генетичних ліній C57BL/6J (1) і CBA/CaLac (2) при вісцеральному (а) та при соматичному стимулах (б)

ному болю також майже вдвічі була більшою і становила $672,5 \pm 114,9$ та $322,7 \pm 88,7$ с у порівнянні з тваринами лінії C57BL/6J ($n=10$; $P<0,05$). Для решти поведінкових проявів (переміщення, вмивання) достовірних змін при соматичному болю не виявлено (див. рис. 3,б; 4,б). Таким чином, у двох досліджуваних генетичних лініях тварин поведінковий прояв вісцерального болю докорінно відмінний від соматичного. Все це може свідчити про існування різних шляхів розвитку вісцерального та соматичного синдрому. Не виключено також, що тварини двох генетичних ліній мають різну чутливість окремо до вісцерального та соматичного болювого стимулів. Так, нами та іншими дослідниками встановлено, що болювий поріг на електричний стимул у тварин лінії CBA/

CaLac нижчий від болювого порогу тварин лінії C57BL/6J [6, 10], тобто тварини лінії CBA/CaLac більш чутливі до болювого електричного стимулу. Припускається, що більш високий руховий прояв поведінки тварин лінії C57BL/6J при соматичному болю спричиняється різним співвідношенням в мозку допаміну, норадреналіну, серотоніну [9, 10], опіоїдних рецепторів [19], підвищеним вмістом ендogenous пептиду Orphanin FQ/Nociceptin (OFQ/N), який модулює емоційну поведінку цих тварин [15]. Загальний розвиток болювого синдрому значною мірою залежить від реактивності нервової системи тварин на різні подразники. Визначення чутливості окремо до кожного із застосованих ноцицептивних стимулів дало б більш однозначну відповідь на розбіжності в розвитку вісцерального й

соматичного болю у тварин цих двох генетичних груп. Отримані розбіжності характеру поведінкових реакцій на соматичний і вісцеральний біль можуть бути викликані особливостями функціональної організації центральних структур мозку, які беруть участь у формуванні ноцицептивних вісцеральних і соматичних рефлексів у тварин різних генетичних ліній.

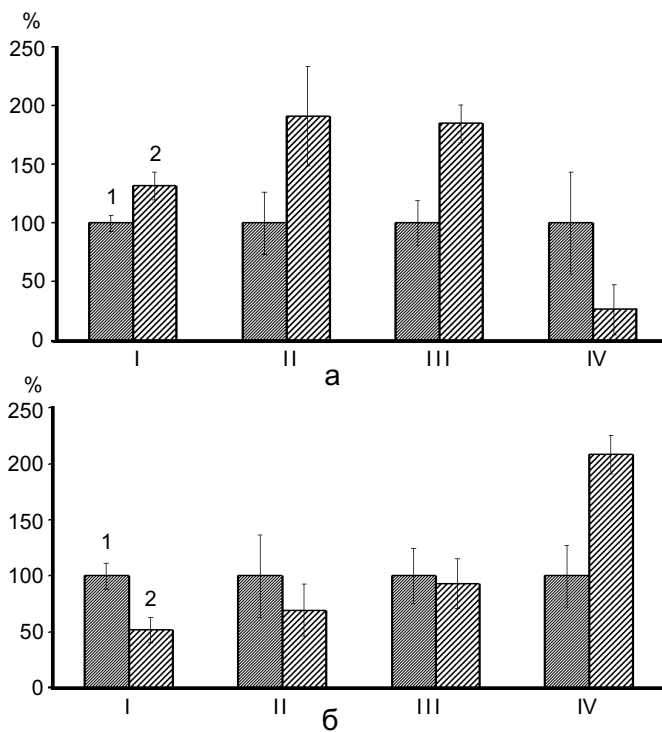


Рис. 4. Відмінності між деякими проявами поведінки тварин генетичних ліній C57BL/6J (1) і CBA/CaLac (2) при вісцеральному (а) і соматичному стимулах (б). За всією ординат – тривалість прояву поведінки тварин генетичної лінії CBA/CaLac у (%) до відповідного поведінкового прояву тварин C57BL/6J (100 %) за 60 хв спостережень: I – біль, II – переміщення, III – умивання, IV – сон

B. S. Sushko

DEVELOPMENT OF VISCERAL PAIN UNDER INFLUENCE OF THE NOCICEPTIVE STIMULE AND GENETIC FACTORS

The experimental research of painful behavioural reaction on nociceptive visceral stimulus with outbred white and of the C57BL/6J and CBA/CaLac genetic strains of mice was carried out. Influence of intraperitoneal administration of the different volumes and concentration of acetic acid solution on visceral painful behavioural reaction at these animals was shown. It was found that CBA/CaLac had a higher intensity of visceral painful behavioural reaction (on 32 %), than C57BL/6J strain. Comparison of intensity of behavioural reactions to a somatic pain in these animals (the formalin test) has shown that at CBA/CaLac this

intensity was lower by 48.5 % than in C57BL/6J strain. Such distinctions in the character of behavioural reactions on somatic and visceral pain may be caused by features of the functional organization of the brain central structures participating in the formation of visceral and somatic reflexes at these two genetic strains.

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

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Аршавский И. А. Физиологические механизмы и закономерности индивидуального развития. – М.: Наука, 1982. – 268 с.
2. Бландова З. К., Душкин В. А., Малашенко 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 // Вестн. новых мед. технологий. – 2002. – 9, № 1. – С. 16–18.
4. Кодряшова Н. Н., Сытников А. П. Effect of emotionality, exploratory activity and pain sensitivity on manifestation of agonistic behavior in the mouse // Журн. высш. нерв. деятельности им. И.П. Павлова. – 1986. – 36, № 4. – С. 686–691.
5. Лиманский Ю. П. Рефлексы ствола головного мозга. – К.: Наук. думка, 1987. – 240 с.
6. Сушко Б. С., Будак А. В. Особливості больової реакції та чутливості тварин різних генетичних груп // Фізіол. журн. – 2004. – 50, № 2. – С. 75–79.
7. Черниговский В. В. Интероцепция. – Л.: Наука, 1985. – 413 с.
8. Юматов Е. А., Мещеряков О. Л. Прогнозирование устойчивости к эмоциональному стрессу на основе индивидуального тестирования поведения // Журн. высш. нерв. деятельности им. И.П. Павлова. – 1990. – 40, № 3. – С. 575.
9. Avgustinovich D. F., Lipina T. V., Kudriavtseva N. N. Response of the serotonergic brain system to social stress of various duration in male mice C57BL/6J and CBA/Lac // Ross. Fiziol. Zh. Im. I. M. Sechenova. – 2001. – 87, № 4. – P. 532–542.
10. Belzung C., El Hage W., Moindrot N., Griebel G. Behavioral and neurochemical changes following predatory stress in mice // Neuropharmacology. – 2001. – 41, № 3. – P. 400–408.
11. Daughters R. S., Rivard, R., Simone D. A., Reichert J. A. Peripheral and preemptive opioid antinociception in a mouse visceral pain model // Pain. – 2001. – 89, № 2–3. – P. 221–227.
12. Ferraro T.N., Golden G.T., Smith G.G. et al. Mouse strain variation in maximal electroshock seizure threshold // Brain Res. – 2002. – 936, № 1–2. – P. 82–86.
13. Garcia-Nicas E., Cervero F., Martinez-Caro L., Laird J. M. A new model of visceral pain and referred hyperalgesia in the mouse // Pain. – 2001. – 92, № 3. – P. 335–342.
14. Gebhart G. F., Joshi S. K. Visceral pain // Current review of pain. – 2000. – 4, №6. – P. 499–506.
15. Kawashima N., Fugate J., Kusnecov A. Immunological challenge modulates brain orphanin FQ/nociceptin and nociceptive behavior // Brain. Res. – 2002. – 949, № 1–2. – P.71.
16. Ladabaum U., Owyang C. Pathobiology of visceral pain: molecular mechanisms and therapeutic implications V. Central nervous system processing of somatic and visceral sensory signals // Amer. J. Physiol. – gastrointest. and liver Physiol. – 2000. – 279, № 1. – C. 1–6.
17. Laird J. M., Olivar T., Roza C. et al. Deficits in visceral pain and hyperalgesia of mice with a disruption of the tachykinin NK1 receptor gene // Neuroscience. – 2000. – 98, № 2. – P. 345–352.
18. 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. – 2000. – 84, № 1. – P. 111–112.
19. Raffa R.B., Mathiasen J.R., Kimball E.S., Vaught J.L. The combined immunological and antinociceptive defects of beige-J mice: the possible existence of a “murepressin” // Life Sci. – 1993. – 52, № 1. – P.1–8.
20. Wilson S. G., Chesler E. J., Hain H. et al. Identification of quantitative trait loci for chemical/inflammatory nociception in mice // Pain. – 2002. – 96, № 3. – P. 385–391.

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

Матеріал надійшов до редакції 25.01.2005