

БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ

Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского

Серия «Биология, химия». Том 22 (61). 2009. № 1. С. 3-8.

УДК 612.884.002.56:594.38

УСТАНОВКА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ БОЛЕВОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ НАЗЕМНЫХ МОЛЛЮСКОВ *HELIX ALBESCENS*

Вишневский В.Г., Костюк А.С., Темуриянц Н.А., Бугаец Е.В., Макаренко И.А.

Сконструирована установка, позволяющая определить ряд параметров болевой чувствительности моллюсков: болевой порог, латентный период болевой реакции, температура и продолжительность реакции полного избегания ноцицептивного стимула. Отличительной особенностью установки является горячая пластинка, изготовленная из стекла с напылением нитрид титана. Такая конструкция позволяет медленно изменять температуру пластинки.

Ключевые слова: *Helix albescens*, болевая чувствительность, экспериментальная установка.

ВВЕДЕНИЕ

Электромагнитные поля (ЭМП) различных параметров, являясь важной составляющей среды обитания, оказывают разнообразное влияние на человека и животных, зачастую вызывая неблагоприятные изменения здоровья [1]. Однако, и изоляция от ЭМП (электромагнитная депривация) приводит к существенным изменениям функционального состояния живых систем. Но если феноменология влияний ЭМП, «загрязняющих» среду, изучена достаточно полно, то влияние ослабленных полей исследовано не достаточно. Между тем, ослабление ЭМП различных параметров распространено как в производственных, искусственных (метро, самолеты, шахты и т.д.), так и в естественных (пещерах) условиях.

При изучении эффектов действия любого фактора всегда остро стоит вопрос о выборе объекта исследования. В настоящее время эксперименты на млекопитающих не приветствуются научной общественностью по этическим причинам. Кроме того, такие эксперименты трудоемки, экономически труднодоступны. Поэтому предпочтение отдается экспериментам с использованием тест-систем, а также беспозвоночных животных. Примером тест-системы, широко используемой в электромагнитной физиологии и биофизике, являются регенерирующие планарии [2]. Эта модель отличается простотой, доступностью, хорошей воспроизводимостью результатов.

Не менее информативными и доступными являются эксперименты на беспозвоночных, в частности, на моллюсках. Как наземные [3, 4], так и морские моллюски [5] используются для изучения не только феноменологии, но и механизмов действия электромагнитных факторов.

В частности, для этих целей часто применяется тест «горячая пластинка». Используя этот тест, можно моделировать стресс-реакцию у животных (при температуре горячей пластинки $t \geq 50^{\circ}\text{C}$) [6], а также изучать болевую чувствительность ($t = 40,0 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$) [4, 7]. В этом случае болевая чувствительность оценивается по латентному периоду реакции избегания. Однако более полная характеристика болевой чувствительности может быть дана при изучении ее болевого порога. Поэтому целью настоящей работы явилась разработка метода регистрации болевого порога у моллюсков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования явилась болевая чувствительность наземных брюхоногих моллюсков *Helix albescens*, широко распространенных на территории Крымского полуострова. Сбор улиток производился в поле, вдали от предприятий, линий электропередач. Моллюсков содержали в аквариуме при температуре $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, высокой влажности, при естественной освещенности (цикл свет-темнота, 12:12 ч) и избытке пищи (капуста, морковь).

В эксперименте использовались половозрелые особи, одинаковые по массе и размерам. До эксперимента улитки не менее одной недели находились в активном состоянии.

Для обоснования метода регистрации параметров болевой чувствительности улиток было изучено их поведение при подаче ноцицептивного стимула. В начале предъявления стимула ($t = 22^{\circ}\text{C}$) (рис. 1, А) для улиток характерно распластанное положение на поверхности пластинки, разведывательное поведение, пальпация щупальцами субстрата, изучение окружающей среды.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для реализации поставленных задач, учитывая биологию (поведенческие реакции) улитки, для изготовления пластинки (1) (рис. 2) нами был выбран материал с высоким омическим сопротивлением, обеспечивающий медленный подъем температуры. Таким материалом явилось стекло марки К8, имеющее ряд преимуществ перед металлом: 1) стекло полупрозрачное, поэтому при условии наблюдения за реагирующим животным снизу, могут быть количественно оценены изменения зоны соприкосновения его подошвы с поверхностью пластинки; 2) поверхность стекла, на котором располагается подопытное животное, является диэлектриком, поскольку полупрозрачный токопроводящий слой (выделяющий омическое тепло) наносится на нижнюю сторону пластинки; 3) подбором толщины токопроводящего слоя можно варьировать его резистивные свойства. Все это делает возможным оптимальное управление скоростью нарастания температуры, величиной напряжения на контактных площадках пластинки, благодаря чему можно точно регистрировать минимальную температуру, при которой начинается реакция избегания (болевого порог), и латентный период.

УСТАНОВКА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ БОЛЕВОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ

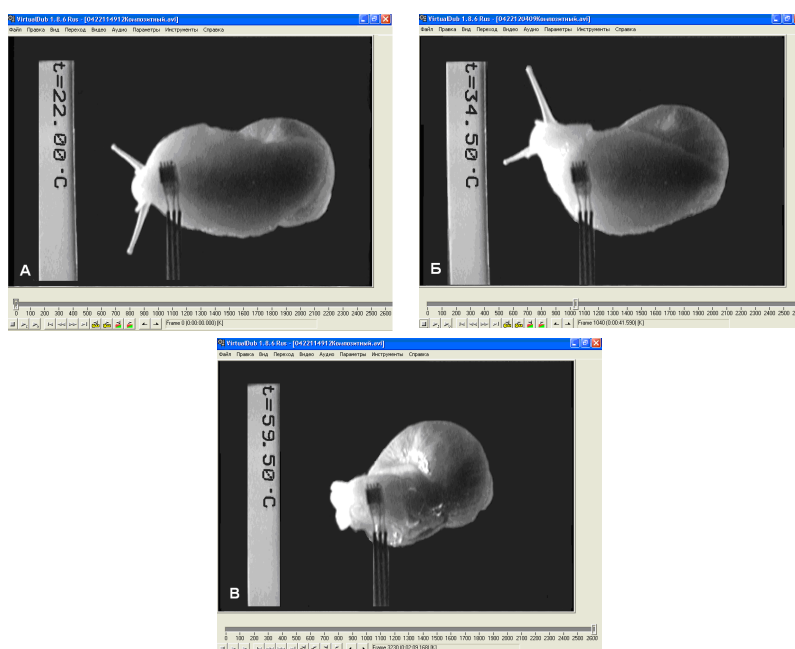


Рис. 1. Поведенческая реакция брюхоногого моллюска *Helix albescens* при действии теплового стимула. Внизу рисунка представлена шкала значений времени в секундах, сбоку – температура пластинки в градусах Цельсия.

Фото с экрана персонального компьютера (Print Screen SysRq). А – начальные экспериментальные условия (распластывание улитки на стеклянной пластинке при $t = 22^{\circ}\text{C}$); Б – поднятие ноги над поверхностью стеклянной пластинки при минимальных значениях температуры ($t = 34,5^{\circ}\text{C}$ – болевой порог); В – реакция полного избегания.

С нижней стороны стеклянной пластинки методом распыления в вакууме нанесено полупрозрачное напыление нитрид титана (TiN) с толщиной слоя 0,17 мкм. Важным свойством примененного покрытия является его устойчивость к механическому износу и условиям повышенной влажности.

Блок-схема экспериментальной установки представлена на рис. 2.

Напыленные участки контактируют со специальными площадками из нержавеющей стали (2), на которые подается напряжение от источника питания (3). Было установлено, что стеклянная пластинка может быть нагрета до необходимой температуры со скоростью 0,2 °/сек-0,4 °/сек при изменениях тока на контактах в пределах 0,35 – 0,55 А.

Изменение температуры пластинки фиксируется цифровым термометром DS18B20 (8-Pin μSOP) (7), закрепленным на внешней стороне стекла при помощи термопасты. Диапазон измеряемых им температур от -10°C до $+85^{\circ}\text{C}$ с точностью до $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Термометр подключен к микроконтроллеру (8), который по средствам цифровой связи обеспечивает индикацию значений температуры в градусах Цельсия на 16-ти сегментном жидкокристаллическом экране (9). Затем это значение

температуры внутри видеокadra проецируется на монитор персонального компьютера.

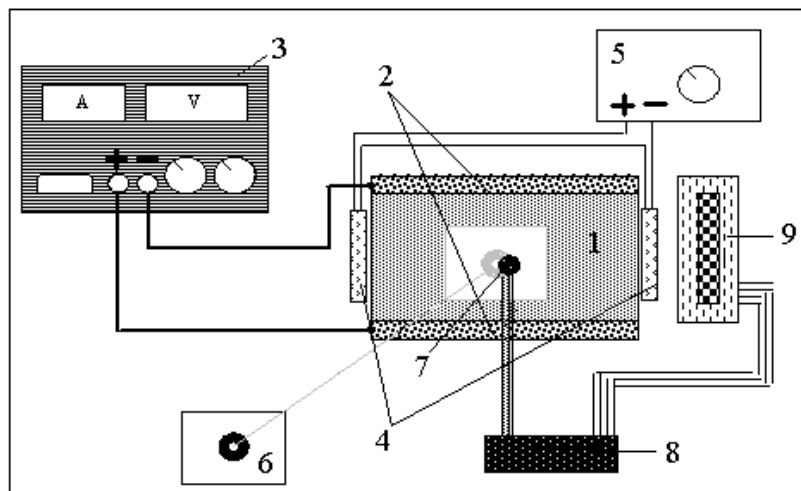


Рис. 2. Блок-схема установки для регистрации болевого порога виноградной улитки. 1 – стеклянная пластина; 2 – контактные площадки; 3 – источник питания; 4 – набор компактных ламп накаливания; 5 – источник напряжения; 6 – бескорпусная (чиповая) камера; 7 – цифровой датчик; 8 – микроконтроллер; 9 – жидкокристаллический экран.

Регистрирующим устройством движения улитки является бескорпусная (чиповая) камера (6) черно-белого изображения с разрешением 520 линий по вертикали, подключенная к линейному видеовходу TV-тюнера персонального компьютера. Камера расположена в корпусе короба, изготовленного из стеклотекстолита, снизу от горячей пластинки. Благодаря такому расположению камеры поднятая над поверхностью пластины часть ноги улитки выглядит более светлой, чем часть, распластанная на стекле. Сбоку объект освещается двумя наборами ламп накаливания (6 В, 50 мА) (4), которые включены последовательно и помещены в корпус. Для повышения точности фиксации поведенческих актов (поднятия ноги) улитки подсветка регулируется источником напряжения (5) и осуществлена по принципу «темного поля». Видеозапись движения улитки фиксирует изменения температуры во времени, благодаря чему возникает возможность определить порог болевой реакции, температуру и продолжительность реакции полного избегания. Латентный период и время избегания определяется при помощи покадрового разложения полученного с камеры видеоряда с использованием программного обеспечения VirtualDub 1.8.6 Rus.

Таким образом, сконструированное устройство позволяет определить параметры болевой чувствительности улиток (болевой порог, латентный период болевой реакции, температура и время реакции полного избегания).

В предварительно проведенных экспериментах выявлен болевой порог улиток *Helix albescens*, колебания которого находились в пределах $32 \pm 4^\circ\text{C}$, латентный

период болевой реакции – 10 ± 4 сек, температура полного избегания горячей поверхности – $56 \pm 4^\circ\text{C}$, а продолжительность реакции избегания – 10 ± 3 сек.

В литературе существуют сведения о величине латентного периода на ноцицептивное раздражение у улиток других видов. Согласно Frank S. Prato [4], у моллюсков *Cepaea nemoralis* латентный период реакции избегания составляет 4,8-6,5 сек, что несколько меньше значений, зарегистрированных нами. Это может быть связано как с различной конструкцией пластинки, так и с видовыми различиями используемых в эксперименте улиток. Данные значения могут изменяться при действии ЭМП различных параметров [8], света [3, 8].

ВЫВОДЫ

1. Сконструирована установка, позволяющая определить параметры болевой чувствительности моллюсков (болевой порог, латентный период).
2. Особенностью установки является горячая пластинка, изготовленная из стекла с напылением нитрид титана.

Благодарности. Авторы выражают благодарность кандидату физико-математических наук, доценту кафедры радиофизики и электроники Таврического национального университета им. В.И. Вернадского Григорьеву Е.В. за помощь в конструировании установки.

Список литературы

1. Пресман А. С. Электромагнитные поля и живая природа. – М.: Наука, 1986. – 210 с.
2. Влияние слабого комбинированного магнитного поля на скорость регенерации планарий *Dugesia tigrina* / Х. П. Тирас, Л. К. Сребницкая, Е. Н. Ильясова, В. В. Леднев // Биофизика. – 2007. – Т. 52(2). – С. 372-375.
3. Light-dependent and -independent behavioural effects of extremely low frequency (ELF) magnetic fields in a land snail are consistent with a parametric resonance mechanism (PRM) / F. S. Prato, M. Kavaliers, A. P. Cullen, A. W. Thomas // Bioelectromagnetics. – 1997. – Vol. 18 – P.284-291.
4. Prato F. S. Behavioural evidence that magnetic field effects in the land snail, *Cepaea nemoralis*, might not depend on magnetite or induced electric currents / F. S. Prato, M. Kavaliers, J. J. L. Carson // Bioelectromagnetics. – 1996a. – Vol. 17 – P.123-130.
5. Lohmann K. J. Lunar-modulated geomagnetic orientation by a marine mollusk / K. J. Lohmann and A. O. D. Willows // Science. – 1987. – Vol. 235 – P. 331-334.
6. The terrestrial Gastropoda *Megalobulimus abbreviatus* as a useful model for nociceptive experiments. Effects of morphine and naloxone on thermal avoidance behavior / M. Achaval, M. A. P. Penha, A. Swarowsky, P. Rigon, L. L. Xavier, G. G. Viola, D. M. Zancan // Brazilian Journal Medical and Biological Research. – January 2005. – Vol. 38 (1) – P.73-80.
7. Kavaliers M. A functional role for an opiate system in snail thermal behavior / M. Kavaliers, M. Hirst, G. C. Teskey // Science. – 1983. – Vol. 220 – P.99-101.
8. Prato F. S. Extremely low frequency magnetic fields can either increase or decrease analgesia in the land snail depending on field and light conditions / F. S. Prato, M. Kavaliers, A. W. Thomas // Bioelectromagnetics. – 2000. – Vol. 21 – P. 287-301.

*Вишневецький В.Г., Костюк О.С., Темуриянц Н.А., Бугаєць Є.В., Макаренко І.О. Установка для вивчення больової чутливості наземних молюсків *Helix albescens* // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2009. – Т. 22 (61). – № 1. – С. 3-8.*

Сконструйована установка, що дозволяє визначити ряд параметрів больової чутливості моллюсків: больовий поріг, латентний період больової реакції, температура і тривалість реакції повного уникнення ноціцептивного стимулу. Відмітною особливістю установки є гаряча пластинка, виготовлена зі скла з напленням нітрид титану. Така конструкція дозволяє повільно змінювати температуру пластинки.

Ключові слова: *Helix albescens*, больова чутливість, експериментальна установка

Vishnevskiy V.G., Kostyuk A.S., Temuryants N.A., Bugaets E.V., Makarenko I.A. Construction of an instrument for pain perception studies in terrestrial gastropoda helix albescens // Uchenye zapiski Tavricheskogo Natsionalnogo Universiteta im. V. I. Vernadskogo. Series «Biology, chemistry». – 2009. – V.22 (61). – № 1. – P. 3-8.

A devise has been constructed that allows for testing of several parameters of pain perception in mollusca – pain threshold, latent period of the pain reaction, temperature and duration of avoidance of a nociceptive stimulus. A special feature of this devise is a hot plate made of glass covered with a thin layer of titanium nitride. This feature allows for slow changes in the plate temperature.

Keywords: *Helix albescens*, pain perception, experimental devise.

Поступила в редакцію 30.04.2009 з.