

УДК 612.014.42./019:591.112.1:599.323.4

УЧАСТИЕ ОPIOИДНОЙ СИСТЕМЫ В ИЗМЕНЕНИЯХ НОЦИЦЕПЦИИ МЫШЕЙ ПРИ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОМ ЭКРАНИРОВАНИИ

Костюк А.С.

*Таврический национальный университет имени В.И. Вернадского, Симферополь, Республика
Крым, Российская Федерация
E-mail: alexkostyuk@mail.ru*

В экспериментах на мышцах подтверждены данные об изменении активности опиоидной системы, полученные ранее на моллюсках. Подтверждено, что активность опиоидной системы на разных этапах действия электромагнитного фактора изменяется неодинаково: снижение ее активности, в силу чего прогрессирует гипералгезия, имеющая место в начальный период пребывания животных в условиях экранирования, далее ее активация (II фаза), результатом чего является нивелирование антиноцицептивного эффекта электромагнитного экранирования. III стадия – прогрессирующее уменьшение активности опиоидной системы, в силу чего антиноцицептивный эффект постепенно редуцируется.

Ключевые слова: опиоидная система, электромагнитное экранирование, налоксон, ноцицепция, мышцы.

ВВЕДЕНИЕ

Изучение механизмов действия электромагнитных факторов привлекает внимание многих исследователей. Ранее нами были показаны фазные изменения ноцицептивной чувствительности моллюсков *Helix albescens* при действии ослабленного электромагнитного поля (ЭМП), а также ЭМП сверхнизкочастотного и крайневых высокочастотного диапазонов [1, 2]. Выявлены сходства и различия в действии этих факторов. Однако механизмы изменения ноцицепции под влиянием данных факторов остаются не изученными.

В конце XX в. А.Н. Фреу высказал предположение о том, что в ответ на действие электромагнитных факторов различной природы и интенсивности изменяется активность опиоидной системы, которая является древней сигнальной системой [3]. В дальнейшем были получены многочисленные экспериментальные данные, подтверждающие, что ЭМП модулируют разнообразные физиологические процессы, в регуляции которых принимает участие эта система.

Достаточно подробно изучены изменения болевой чувствительности и роль опиоидов в этом процессе в экспериментах на животных [4], в клинических наблюдениях [5-7] при действии ЭМП крайневых высокочастотного диапазона.

Кроме того, ранее нами была показана роль опиоидной системы в изменениях ноцицепции беспозвоночных животных – наземных моллюсков *Helix albescens* – в условиях ослабленного ЭМП электромагнитным экранированием (ЭМЭ) [1]. Однако участие опиоидов в изменениях ноцицепции позвоночных животных,

обусловленных многодневным действием ослабленного ЭМП, не изучено. В связи с изложенным целью исследования явилось выявление роли опиоидной системы в изменениях ноцицепции мышей при ЭМЭ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проведены на половозрелых лабораторных мышах-самцах весом 10 ± 2 г с соблюдением общих принципов биоэтики в соответствии с международными принципами Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или других научных целей (2010), под контролем комиссии по биоэтике Таврического национального университета имени В.И. Вернадского.

Для реализации поставленной цели было проведено несколько серий экспериментов. В каждой серии животных делили на две равноценные группы. Животных обеих групп помещали в ящики из светонепроницаемого пластика, крышки и стенки которых имели вентиляционные отверстия. Обеспечивался свободный доступ мышей к стандартному для грызунов корму и воде. Контейнеры с животными экспериментальной группы ($n=30$) помещались в экранирующую камеру ежедневно с 13^{00} до 9^{00} ч следующего дня, т.е. они находились в условиях ЭМЭ 20 часа в сутки в течение 10 дней.

Ящики с животными контрольной группы ($n=30$) находились за пределами камеры в той же комнате. Для животных обеих групп соблюдался одинаковый режим температуры ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), влажности, освещенности, шума. Ежедневно с 9^{00} до 13^{00} ч животных обеих групп извлекали из ящиков для тестирования и уборки клеток. Освещенность внутри и вне камеры, а также внутри ящиков с животными обеих групп измерялась с помощью люксметра ТКЛ-ПКМ (модель 63). Внутри ящиков освещенность колебалась от 0,1 до 0,2 лк, внутри экранирующей камеры, а также в лаборатории, где содержались крысы контрольной группы, была такого же уровня, а в лаборатории, в которой проводили тестирование, уборку клеток и т.д., колебалась от 480 до 500 лк. Таким образом, животные находились в условиях темнота : свет 20 : 4 ч.

В каждой из описанных групп животные были разделены на три подгруппы: животные первой подгруппы оставались интактными (контроль), животным второй подгруппы вводили налоксон (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA): – внутрибрюшинно в дозе 5 мг/кг, мышам третьей подгруппы вводился эквивалентный объем физиологического раствора. Каждая подгруппа состояла из 10 мышей.

Ослабление фонового ЭМП достигалось применением экранирующей камеры размером $2 \times 3 \times 2$ м, изготовленной из двухслойного железа «Динамо». Коэффициент экранирования $V_{\text{ДС}}$, измеренный с помощью феррозондового магнитометра, составляет для вертикальной составляющей 4,4, для горизонтальной – 20. Изменялась также спектральная плотность магнитного шума в камере как в области ультранизких (от 2×10^{-4} Гц до 0,2 Гц), так и в области радиочастот (от 15 Гц до 100 кГц). В области сверхнизких частот измерения производились с помощью феррозондового магнитометра в паре со спектроанализатором, в области

радиочастот – индукционным методом. Внутри камеры для частот выше 170 Гц и в области частот от 2×10^{-3} до 0,2 Гц уровень спектральной плотности магнитного шума ниже $10 \text{ нТл/Гц}^{0.5}$. Коэффициент экранирования камеры на частотах 50 и 150 Гц порядка трех. В области частот от 150 Гц до 100 кГц происходит слабое экранирование, тогда как на частотах больше 1 МГц имело место полное экранирование.

Таким образом, в нашем исследовании имело место умеренное ослабление как постоянной, так и переменной компонент магнитного поля Земли, в отличие от значительных (100 и более раз) уменьшении таковых, применяемого в подавляющем большинстве исследований [8-9].

Регистрацию показателей реакции избегания проводили у каждого животного ежедневно на свету до нормализации параметров ноцицепции (10 суток).

О состоянии термоноцицептивной чувствительности животных судили по латентному периоду (ЛП) реакции избегания в тесте «горячая пластинка», для этого использовалась металлическая пластинка, нагреваемая электрическим током до 45°C . Мышь помещали на пластинку и с помощью секундомера регистрировали латентный период – время, через которое появлялись первые болевые реакции (отдергивание и лизание конечностей) [10]. В этом тесте животному предъявляли по три попытки (через три минуты друг за другом), затем вычисляли среднее арифметическое из трех измерений.

Действие ЭМЭ на параметры термоноцицепции оценивалось по коэффициенту его эффективности (КЭ) [11-12]:

$$K_{ЭМЭ} = \frac{(ЛП_{ЭМЭ} - ЛП_{К}) \pm (\sigma_{ЭМЭ} + \sigma_{К})}{(ЛП_{К} \pm \sigma_{К})} \cdot 100\% \quad (1),$$

где $K_{ЭМЭ}$ – коэффициент эффективности ЭМЭ, $ЛП_{ЭМЭ}$ – значение ЛП в группе животных, подвергнутых ЭМЭ, $ЛП_{К}$ – значение ЛП в контрольной группе животных, $\sigma_{ЭМЭ}$ и $\sigma_{К}$ – среднеквадратические отклонения измерений в опыте и контроле соответственно.

Отрицательные значения этого коэффициента свидетельствуют о развитии состояния относительной гипералгезии (значения ЛП меньше, чем в группе контроля), а положительные – о состоянии гипоалгезии.

Влияние налоксона на параметры ноцицепции животных оценивалось по коэффициенту его эффективности ($K_{Эн}$):

$$K_{Эн} = \frac{(ЛП(эмэ + н) - ЛП(эмэ + фр)) \pm (\delta(эмэ + н) + \delta(эмэ + фр))}{(ЛП(эмэ + фр) \pm \delta(эмэ + фр))} \cdot 100\% \quad (2),$$

где $K_{Эн}$ – коэффициент эффективности налоксона, $ЛП_{эмэ+н}$ – значение ЛП у животных, подвергнутых влиянию ЭМЭ и введению налоксона, $ЛП_{эмэ+фр}$ – значение ЛП у животных, подвергнутых влиянию ЭМЭ на фоне введения

физиологического раствора, $\delta_{эмэ+н}$ и $\delta_{эмэ+фр}$ – среднеквадратические отклонения измерений в соответствующих группах.

Отрицательные значения этого коэффициента расценивались как снижение им ноцицепции.

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета специализированных программ «MedStat». Вычисляли среднее значение и ошибку среднего ($\bar{x} \pm S\bar{x}$). Сравнение средних величин различных показателей проводили по t-критерию Стьюдента, целесообразность применения которого была показана проверкой полученных данных на закон нормального распределения. Для оценки достоверности различий исследуемых показателей применялся однофакторный дисперсионный анализ. Оценивалась достоверность различий показателей термоноцицептивной чувствительности между группами (p_1), а также между исходными значениями и данными, полученными каждый день эксперимента в пределах групп (p_2). Различия между группами считали значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что ЭМЭ вызывает трехфазные изменения ноцицепции у мышей. В течение первых-вторых суток эксперимента ЛП реакции избегания животных не изменяется (рис. 1).

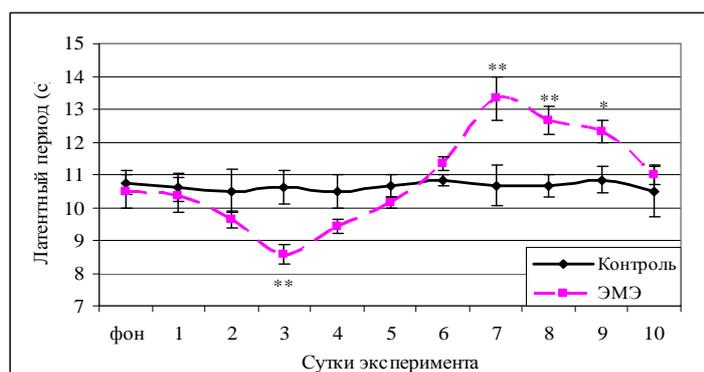


Рис. 1. Динамика ($\bar{x} \pm S\bar{x}$) латентного периода (с) интактной группы мышей и животных, находившихся в условиях электромагнитного экранирования.

Примечание: * – различия статистически значимы между группами: * – ($p_1 < 0,05$), ** – ($p_1 < 0,01$).

На третьи сутки эксперимента у мышей регистрируется прогрессивное нарастание гипералгезии, о чем свидетельствует снижение КЭмэ до $-19,37 \pm 2,2\%$ ($p_2 < 0,001$). Вторая фаза изменений термоноцицептивной чувствительности при ЭМЭ заключается в развитии антиноцицептивного эффекта, который достигал максимума на седьмые-восьмые сутки эксперимента ($KЭмэ = 25,08 \pm 1,69\%$ ($p_2 < 0,001$)). В течение третьей стадии (девятые-десятые сутки) антиноцицептивный эффект ЭМЭ у мышей постепенно снижался, достигая исходного уровня данных.

Выявленные трехфазные изменения ноцицепции мышей в условиях ЭМЭ согласуются с данными, полученными в аналогичных экспериментах на наземных моллюсках. Однако следует отметить, что изменения ноцицепции при ЭМЭ у мышей не только развиваются более быстро, чем у беспозвоночных животных, но и гораздо более выражены: максимальное увеличение чувствительности моллюсков при термостимуляции (гипералгезия) отмечалось позже, гипоалгетический эффект был в 3,4 раза меньше, чем у мышей [13]. Это может быть связано с тем, что у позвоночных животных преобладают миелиновые нервные волокна, благодаря чему все реакции на действие внешних раздражителей развиваются намного быстрее, чем у беспозвоночных, у которых характерно преобладание немиелинизированных волокон с низкой скоростью передачи нервного импульса. Следовательно, изучение механизмов влияния электромагнитных факторов удобнее проводить на животных низших таксономических групп, так как все реакции растянуты во времени, что позволяет более детально изучить исследуемые эффекты.

Фазные изменения термоноцицептивной чувствительности обнаружены и другими авторами в экспериментах на мышах, которые пребывали в μ -боксе, ослабляющем переменное магнитное поле частотой 0-100 Гц в 125 раз, а постоянное – до 1 мТл [14].

Как показали проведенные исследования, в изменении ноцицепции при ЭМЭ важную роль играет опиоидная система.

Если введение физиологического раствора интактным мышам не вызывает изменений параметров ноцицепции, то инъекция налоксона приводила к разнонаправленным изменениям в различные дни исследования показателей ноцицепции мышей относительно животных, которым вводился физиологический раствор в эквивалентном объеме. Однако эти изменения во все сроки наблюдения были недостоверны.

В экспериментах на мышах, у которых были блокированы налоксоном опиоидные рецепторы, в условиях экранирования также выявлены фазные изменения ноцицепции. Отмечается усиление гипералгетического эффекта уже со вторых суток эксперимента. На четвертые сутки наблюдения зарегистрировано снижение КЭмэ+н более чем в два раза больше по сравнению с животными, которым вводился физиологический раствор (КЭмэ+фр = $-10,21 \pm 3,88\%$, КЭмэ+н = $-26,51 \pm 2,05\%$) (рис. 2, А).

Одной из причин первоначально развивающейся при действии ослабленного ЭМП гипералгезии может быть обнаруженное нами снижение активности опиоидной системы. Так, анализ динамики КЭн показал, что в первые-пятые сутки имело место снижение данного показателя до $-19,14 \pm 2,37\%$ ($p_2 < 0,001$), с чем может быть связано увеличение чувствительности моллюсков к термическому стимулу (рис. 2, Б).

Усиление гипералгезии сменялось снижением антиноцицептивного эффекта ЭМЭ – на шестые сутки налоксон снимал, а в последующие сутки несколько уменьшал этот эффект (на седьмые сутки на 80% ($p_1 < 0,01$)).

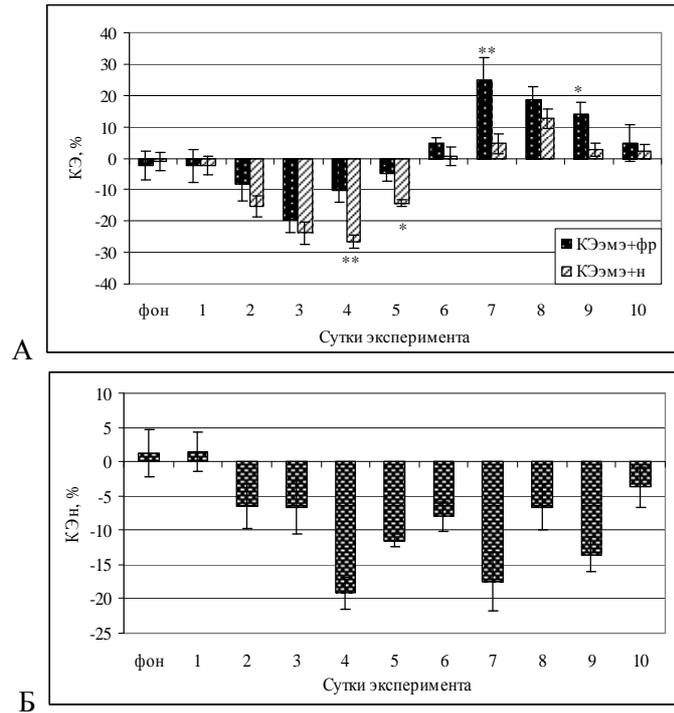


Рис. 2. Динамика ($\bar{x} \pm S\bar{x}$) коэффициентов эффективности (%) электромагнитного экранирования (А) у мышей при ежедневном введении налоксона (КЭмэ+н) и физиологического раствора (КЭмэ+фр) и коэффициента эффективности (%) налоксона (КЭн) у мышей (Б).

Примечание: * – различия статистически значимы между группами: * – ($p_1 < 0,05$), ** – ($p_1 < 0,01$), *** – ($p_1 < 0,001$).

Таким образом, неселективный блокатор опиоидных рецепторов значительно модифицирует изменения ноцицепции мышей при ЭМЭ. Эта модификация заключается в усилении гипералгетического эффекта и снижении антиноцицептивного. Такие изменения ноцицепции при введении налоксона, по-видимому, обусловлены фазными изменениями активности опиоидной системы. На разных этапах действия электромагнитных факторов ее вклад в изменения ноцицепции неодинаков: I фаза – торможение ее активации, в силу чего прогрессирует гипералгезия, далее – возрастание активности (II фаза), результатом чего является полное нивелирование антиноцицептивного эффекта ЭМЭ налоксоном, III фаза – прогрессирующее уменьшение активности опиоидной системы, когда налоксон только редуцирует антиноцицептивный эффект, что, по-видимому, связано с развитием толерантности опиоидов к действию электромагнитных факторов.

Полученные результаты согласуются также с данными F.S. Prato et al. (2005) [14], которые обнаружили, что выраженность анальгетического эффекта экранирования на пятый сутки эксперимента тождественна таковой, вызванной морфином (5 мг/кг), и

эта анальгезия уменьшается, но не исчезает под влиянием налоксона. Таким образом, авторы обнаружили влияние налоксона только в один срок (пятые сутки) экранирования и убедились, что он частично опиоидобусловлен. Полученные нами результаты могут быть расценены как свидетельство фазных изменений активности опиоидной системы при длительном ЭМЭ. Полученные данные могут быть объяснены с точки зрения мелатониновой теории, согласно которой ЭМП снижают секрецию мелатонина.

Из литературных источников известно, что существует тесная взаимосвязь между опиоидной системой и мелатонином: мелатонин стимулирует синтез в различных структурах мозга β -эндорфина [15], а введение агонистов опиоидных рецепторов увеличивает уровень мелатонина в эпифизе крыс [16]. Но решающее значение в развитии мелатонининдуцированной анальгезии играет активация им опиоидных рецепторов [17].

При начальном угнетении секреции мелатонина электромагнитными факторами снижается активность опиоидной системы, т.к. уменьшается продукция β -эндорфина, чувствительность опиоидных рецепторов, результатом чего является развитие гипералгезии. Во II фазе, когда продукция мелатонина усиливается, активируются MT1 и MT2 рецепторы, а также опиоидная и другие антиноцицептивные системы, что и обуславливает развитие антиноцицептивного эффекта.

Таким образом, в механизмах действия ослабленного ЭМП важную роль играет опиоидная система, активность которой на разных этапах действия фактора изменяется фазно. Вероятно, в реализации данного эффекта участвуют и другие системы, обеспечивающие ноцицепцию. На ранних стадиях ведущую роль играет мелатонин, секреция которого под влиянием электромагнитных факторов подавляется. Изменение его секреции в разные фазы воздействия электромагнитных полей влечет за собой неодинаковую активацию опиоидных рецепторов [18]. В последующие сроки действия электромагнитных факторов секреция мелатонина возрастает, благодаря чему он включает опиоидную систему в развитие антиноцицептивного эффекта. Дальнейшие исследования позволят уточнить участие каждой из систем в обеспечении действия электромагнитных факторов низкой интенсивности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. В условиях ЭМЭ активность опиоидной системы изменяется неодинаково.
2. Ослабление естественного ЭМП вызывает снижение опиоидной активности, в силу чего прогрессирует гипералгезия, далее ее активация, сменяющаяся прогрессирующим уменьшением активности опиоидной системы.

Список литературы

1. Темурьянц Н.А. Роль опиоидной системы в модуляции термонцицептивной чувствительности моллюсков при действии слабых электромагнитных факторов / Н.А. Темурьянц, А.С. Костюк // Нейрофизиология. – 2011. – Т. 43 (5). – С. 432–442.
2. Темурьянц Н.А. Электромагнитное излучение крайне высокой частоты, модифицирующее экранобусловленные изменения ноцицепции и активности опиоидной системы у наземных

- моллюсков / Н.А. Темурьянц, А.С. Костюк, К.Н. Туманянц // Биомедицинская радиоэлектроника. – 2014. – №2. – С. 32-40.
3. Frey A.H. Electromagnetic field interactions with biological systems / A.H. Frey // *FASEB J.* – 1993. – Vol. 7, No. 2. – P. 272–281.
 4. Чуян Е.Н. Механизмы антиноцицептивного действия низкоинтенсивного миллиметрового излучения / Е.Н. Чуян, Э.Р. Желдубаева // Монография, Симферополь: «ДИАЙПИ», 2006. – 508 с.
 5. Теппоне М.В. Крайне высокочастотная (КВЧ) - терапия в онкологии / М.В. Теппоне, Р.С. Авакяна // Миллиметровые волны в биологии и медицине. – 2003. – № 1 (29). – С. 3–19.
 6. Кузьменко В.М. Роль мікрохвильової резонансної терапії в комплексному лікуванні хворих на церебральний атеросклероз / В.М. Кузьменко // Лікувальна справа. – 1998. – Т. 7. – С. 146–148.
 7. Usichenko T.I. Treatment of chronic pain with millimetre wave therapy (MWT) in patients with diffuse connective tissue diseases: a pilot case series study / T.I. Usichenko, H.F. Herget // *Eur. J. Pain.* – 2003. – Vol. 7. – P. 289–294.
 8. Asashima M. Magnetic shielding induces early developmental abnormalities in the newt, *Cynops pyrrhogaster* / M. Asashima, K. Shimada, C.J. Pfeiffer // *Bioelectromagnetics.* – 1991. – Vol. 12, Is. 4. – P. 215–224.
 9. Light alters nociceptive effects of magnetic field shielding / A.M. Koziak, D. Desjardins, L.D. Keenlside [et al.] // *Bioelectromagnetics.* – 2006. – Vol. 27 (1). – P. 10–15.
 10. Василенко А.М. Корреляция болевой чувствительности и гуморального иммунного ответа у мышей при термораздражении / А.М. Василенко, О.Г. Яновский, О.В. Коптелов // Бюлл. exper. мед. – 1995. – Т. 4. – С. 405–408.
 11. Влияние крайне слабых переменных магнитных полей на регенерацию планарий и гравитационную реакцию растений / Н.А.Белова, А.М. Ермаков, А.В. Знобищева [и др.] // Биофизика. – 2010. – Т. 55, Вып. 4. – С. 704–709.
 12. Биоэффекты слабых переменных магнитных полей и биологически предвестники землетрясений / В.В. Леднев, Н.А. Белова, З.Е. Рождественская, Х.Г. Тирас // Геофизические процессы и биосфера. – 2003. – Т. 2, (1). – С. 3–11.
 13. Темурьянц Н.А. Участие мелатонина в изменении ноцицепции моллюсков и мышей при длительном электромагнитном экранировании / Н.А. Темурьянц, А.С. Костюк, К.Н. Туманянц // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова РАН. – 2013. – Т. 99 (11). – С. 1333–1342.
 14. Daily Repeated magnetic field shielding induce analgesia in CD-1 mice / F.S. Prato, J.A. Robertson, D. Desjardins, A.W. Thomas // *Bioelectromagnetics.* – 2005. – Vol. 26, Is. 2. – P. 109–117.
 15. Melatonin influences the release of endogenous opioid peptides in rat periaqueductal gray / C.X. Yu, G.C. Wu, S.F. Xu, C.H. Chen // *Sheng Li Xue Bao.* – 2000. – Vol. 52 (3). – P. 207–210.
 16. Chuchuen U. The stimulatory effect of mu- and delta-opioid receptors on bovine pinealocyte melatonin synthesis / U. Chuchuen, M. Ebadi, P. Govitrapong // *Journal of Pineal Research.* – 2004. – Vol. 37 (4). – P. 223–229.
 17. Involvement of the pineal gland and melatonin in murine analgesia / M.L. Lakin, C.H. Miller, M.L. Stott, W.D. Winters // *Life Sciences.* – 1981. – Vol. 29 (24). – P. 2543–2551.
 18. Melatonin: a hormone that modulates pain / M. Ambriz-Tututi, Hi Rocha-Gonzalez, S.L. Cruz, V. Granados-Soto // *Life Science.* – 2009. – Vol. 84 (15–16). – P. 489–498.

Костюк О.С. Участь опіоїдної системи у змінах ноцицепції мишей при електромагнітному екрануванні / О.С. Костюк // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2014. – Т. 27 (66), № 2. – С. 113-122.

В експериментах на мишах підтвержені дані про зміну активності опіоїдної системи, отримані раніше на моллюсках. Підтверджено, що активність опіоїдної системи на різних етапах дії електромагнітного фактора змінюється неоднаково: зниження її активності, в силу чого прогресує гіпералгезія, що має місце в початковий період перебування тварин в умовах екранування, далі її активація (II фаза), результатом чого є нівелювання антиноцицептивного ефекту електромагнітного екранування, III стадія – прогресуюче зменшення активності опіоїдної системи, в силу чого антиноцицептивний ефект поступово редукується.

Ключові слова: опіоїдна система, електромагнітне екранування, налоксон, ноцицепція, миші.