



УКРАЇНА

(19) UA (11) 38741 (13) U
(51) МПК (2006)
A61N 2/00МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ПЕРЕХОДУ ЕУСТРЕСУ В ДИСТРЕС

1

2

(21) u200805924

(22) 07.05.2008

(24) 12.01.2009

(46) 12.01.2009, Бюл.№ 1, 2009 р.

(72) ЧУЯН ОЛЕНА МИКОЛАЇВНА, UA, ДЖЕЛДУ-
БАСВА ЕЛЬВИЗА РАШИДОВНА, UA, ЗАЯЧНИКО-
ВА ТЕТЯНА ВАЛЕНТИНІВНА, UA, ЧУЯН ЄВГЕН
ВИКТОРОВИЧ, UA(73) ТАВРІЙСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИ-
ТЕТ ІМ. В.І.ВЕРНАДСЬКОГО, UA(57) Спосіб визначення переходу еустресу в дис-
трес, що містить створення у тварин гіпокінетично-

го стресу різної тривалості шляхом обмеження їх рухомості, який відрізняється тим, що на тварин, які піддавалися гіпокінетичному стресу різної тривалості, впливають больовими чинниками різної природи (тонічної, вісцеральної, гострої термічної і електростимуляції) і визначають перехід еустресу в дистрес по зміні рівня больової чутливості від зниження (підвищення больового порогу, зменшення тривалості больових реакцій) до підвищення (зменшення больового порогу, збільшення тривалості больових реакцій).

Корисна модель відноситься до області фізіології, однією з проблем якої є вивчення впливу різних стрес-факторів (зокрема, обмеження рухливості, або гіпокінезії (ГК)) на реакції організму людини та тварин.

Відомо, що розвиток ГК стресу характеризується низкою специфічних і неспецифічних змін у функціонуванні практично всіх органів і систем організму: структурними і функціональними порушеннями кістково-м'язового апарату, змінами функцій нервової, симпатoadреналової (САС), гіпоталамо-гіпофізарно-надниркової систем (ГГНС), серцево-судинної, травної, дихальної систем, метаболічними зрушеннями, зниженням неспецифічної резистентності та імунореактивності, зміною прооксидантно/антиоксидантної рівноваги, поведінкових реакцій, розвитком десинхронізації [Коваленко Е.А., Гуровський Н.Н. Гипокинезия. - М.: Медицина, 1980. -307с.; Малыгина В.И. Симпатoadреналовая система крыс при адаптации к гипокинезии: Автореф. дис. канд. биол. наук: 03.00.13 СГУ. -Симферополь, 1989. -23с.; Чуюн Е.Н. Нейроиммуноэндокринные механизмы адаптации к действию низкоинтенсивного электромагнитного излучения крайне высокой частоты: Автореф. дисс. доктора биол. наук: 03.00.13 /КНУ. - Киев, 2004. -40с. та ін.].

В даний час загально визнано, що в основі змін функціонування організму при стресі лежить зміна активності стрес-реалізуючих і стрес-лімітуючих систем, а також дії медіаторів цих систем. Причи-

му, якщо на тлі активації стрес-реалізуючих систем (ГГНС і САС) відбувається збільшення функціональної активності стрес-лімітуючих систем (опіоїд-, серотонін-, дофамінергічних, мелатоніна), виникає «фізіологічний» стрес (еустрес), а при переважанні активності стрес-реалізуючих систем - «патологічний» стрес (дистрес). При цьому важливе значення має виявлення переходу еустресу в дистрес, що і з'явилося завданням нашого дослідження.

Прототипом корисної моделі є дослідження, в якому показано, що зміну активності ендогенної опіоїдної системи відбиває інтенсивність розвитку стрес-реакції та може служити предіндикатором переходу еустресу в дистрес. Так, показано, що тривалий «патологічний» стрес, на відміну від короткочасного «фізіологічного», призводить не до підвищення, а до значного зниження концентрації енкефалінів в крові, порушенню процесів секреції та депонування їх в надниркових залозах [Лішманов Ю.Б., Маслов Л.Н., Маслова Л.В., Кривоногов Н.Г. Опиоидные пептиды в динамике «физиологического» и «патологического» стресса» //Пат. физиология и экспер. терапия. -1990. -№4. -С.7-9].

Недоліком прототипу є той факт, що метод достатньо трудомісткий, вимагає наявності дорогих реактивів для біохімічного аналізу крові, що значно ускладнює застосування даної методики в дослідницьких цілях.

Виходячи з вищевикладеного, завданням даного корисної моделі з'явилася розробка способу

(13) U

(11) 38741

(19) UA

виявлення переходу еустресу в дистрес, що не вимагає наявності дорожніх реактивів для біохімічного аналізу крові.

Суть корисної моделі полягає в тому, що спосіб визначення переходу еустресу в дистрес включає дію на тварин, підданих ГК стресу різної тривалості, больового чинника різної природи (тонічної, вісцеральної, гострої термічної та електростимуляції) і виявлення зміни рівня больової чутливості тварин від зниження (підвищення больового порогу, зменшення тривалості больових реакцій) до підвищення (зменшення больового порогу, збільшення тривалості больових реакцій).

Причинно-наслідковий зв'язок між істотними ознаками корисної моделі та результатом, що досягається, полягає в здатності ГК стресу модифікувати тривалості больових поведінкових реакцій при експериментально викликаних тонічних і вісцеральних больових реакціях, а також змінювати рівень больової чутливості тварин при дії гострого термічного болю і електростимуляції різнонаправлено, залежно від тривалості обмеження рухливості, що, мабуть, пов'язано з тим, що ключовою ланкою, що визначає схильність і стійкість організму до стрес-факторів, є рівень активності різних ланок стрес-реалізуючих і стрес-лімітуючих систем, а також ступінь їх активації під впливом стресу.

Для вивчення впливу ГК стресу на больову чутливість були проведені ряд експериментів на дорослих безпородних білих щурах-самцях масою 180-220 грам ($n = 265$), отриманих з розплідника науково-дослідного інституту біології Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна. Для експериментів відбирали тварин з середнім рівнем рухової активності та низькою емоційністю, що визначалися в тесті «відкрите поле», які, згідно нашим та літературним даним, переважають в популяції і тому можна стверджувати, що у них розвивається найбільш типова реакція на експериментальні дії.

У першій серії експериментальних досліджень вивчалася модифікуюча дія ГК стресу на зміну больової чутливості щурів при експериментально викликаному тонічному соматичному болю в «формаліновому тесті» (ФТ) [Dubuisson D., Dennis S.G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine and brainstem stimulation in rats and cats. -1997. -Vol.C 4. -P.161-164]. Для цього експериментальних тварин розподілили на дві рівноцінні групи по 45 особин в кожній. Тонічний біль у даних тварин першої (ФТ) і другої (ГК+ФТ) груп викликали ін'єкцією 5%-вого розчину формаліну в дорсальну поверхню стопи задньої кінцівки. Тварин другої групи (ГК+ФТ) заздалегідь піддавали дії ГК стресу, який створювався поміщенням щурів у спеціальні пенали з оргскла, що складаються з п'яти осередків, розміри кожного з них складали 140×60×60мм для кожного щура. Такі клітки забезпечують істотне обмеження рухливості тварин по всіх напрямках. Стінки та дно кожного осередку забезпечені спеціальними отворами, що забезпечують вентиляцію та виведення відходів тварин. В описаних пеналах щури експериментальних груп знаходилися по 20 годин на

добу. Протягом решти 4-х годин здійснювали експериментальні дослідження, годування і догляд за тваринами. Отримана експериментальна модель дозволила створити однаковий ступінь «жорсткості» ГК для всіх тварин, що є необхідною умовою для отримання зіставних результатів [Коваленко Е.А., Гуровський Н.Н. Гипокинезия. - М.: Медицина, 1980. -307с.].

Показником больової чутливості була тривалість больової поведінкової реакції (лизання ураженої кінцівки) протягом 90-та хвилин спостереження після ін'єкції формаліну.

У другій серії експериментів вивчалася модифікуюча дія ГК стресу на зміну больової чутливості у щурів при експериментально викликаному вісцеральному болю в «оцтовому тесті» [Ness T.J. Models of visceral nociception //ILAR J. -1999. -Vol.40 №3. -p.119-128]. Експериментальних тварин розподіляли на дві рівноцінні групи по 25 особин в кожній. Тварини першої (ОТ) і другої (ГК+ОТ) груп піддавалися дії вісцерального болю шляхом внутрішньочеревинного введення 2% розчину оцтової кислоти. Щури другої групи знаходилися в умовах дев'ятидобової ГК і щодня піддавалися дії ОТ (ГК+ОТ) і больовій дії. Показником інтенсивності болю була тривалість тонічних поз (корчів) і реакції лизання живота протягом 90-та хвилин спостереження.

У третій серії експериментів моделювали гострий термічний біль у тесті «гарячої пластинки» (ТГП) [O'Callaghan J., Holtzman S.G. Quantification of the analgesic activity of narcotic antagonists by a modified hot-plate procedure //Pharmacol. Exp. Ther. -1979. -Vol.194. -P.497-505] протягом 9-ти діб. Тварин розділили на дві рівноцінні групи по 25 особин - ТГП і ГК+ТГП. Показником больової чутливості у тварин цих груп служив больовий поріг (БП), за який брали мінімальну температуру металевої пластини установки, що супроводжується появою перших больових реакцій (підскакування та лизання кінцівок).

У четвертій серії досліджень використовували тест електростимуляції (ТЕС) для моделювання гострого болю шляхом електричного больового подразнення. Експериментальних тварин розділили на дві групи по 15 особин (ТЕС і ГК+ТЕС) і вимірювали БП по величині сили струму (у міліамперах, мА).

Враховуючи той факт, що у гризунів БП протягом доби варіює [Golombek D.A., Escobar E., Burin L.J. et al. Time-dependent melatonin analgesia in mice: inhibition by opiate or benzodiazepine antagonist //Eur. J. Pharmacol. -1991. -Vol.194 №1. -P.25-30], експерименти проводилися в один і той же час світлої половини доби (з 9.00 до 11.00 годин).

Щурів утримували в умовах віварію при температурі 18-22°C на стандартному харчовому раціоні і в стандартних умовах освітлення (12 годин темнота: 12 годин світло). Світлова фаза починалася о 7.00 ранку.

Статистична обробка матеріалу проводилася шляхом обчислення середнього значення досліджуваних величин (\bar{x}), середнього квадратичного відхилення (σ), помилки середнього арифметично-

го ($S\bar{x}$). Після перевірки отриманих даних на закон нормального розподілу, оцінку достовірності спостережуваних змін проводили за допомогою t-критерію Стюдента. Відмінності між значеннями показників у тварин різних експериментальних груп вважалися достовірними при $p < 0,05$.

Для оцінки модифікуючої дії ГК стресу на больову чутливість було введено коефіцієнт модифікації (КМ, ум. од.), який обчислювався за формулою:

$$KM = (X_{ГК} - X_K) / X_K$$

де $X_{ГК}$ - значення вивченого показника в групі тварин, які до експериментальної дії піддавалися попередній дії ГК; X_K - значення вивченого показника в групі тварин, які до експериментальної дії залишалися інтактними.

Всі дослідження та вимірювання здійснювалися на обладнанні, що пройшло метрологічну перевірку та експертизу.

Як показали результати дослідження, модифікуючий ефект ГК стресу на рівень больової чутливості щурів в експериментальних больових тестах залежав від тривалості обмеження рухливості. При адаптації щурів до нетривалого ГК стресу (1-6-та доба) відзначено зниження больової чутливості, що указує на підвищення резистентності до больового стресу. Так, максимальне зменшення тривалості больових реакцій у ФТ і ОТ реєструвалося після тридобового обмеження рухливості (на 52,51% ($p < 0,01$) і 12,06% ($p < 0,05$) відповідно). У ТГП і ТЕС максимальне підвищення БП зареєстроване після добового обмеження рухливості (на 4,66% ($p < 0,001$) і 180,77%; $p < 0,01$ відповідно). Отримані результати підтверджуються негативними значеннями КМ. від -0,88 до -0,01 ум. од. у різних больових тестах. Оскільки в результаті дії модифікуючого чинника (ГК) прояви больових реакцій в різних тестах зменшилися, отже, має місце позитивний ефект модифікації. Динаміка коефіцієнту модифікації (КМ, ум. од.) ГК стресу на больову чутливість при експериментально викликаних тонічному (ГК+ФТ), вісцеральному (ГК+ОТ) болю, електростимуляції (ГК+ТЕС) (ліва шкала (L)) та гострому термічному (ГК+ТГП) болю (права шкала (R)) у щурів протягом дев'яти діб спостереження, представлена на Фіг.1.

Тривале обмеження рухливості (сьома-дев'ять доба) призвело до збільшення больової чутливості щурів в різних тестах щодо значень у тварин, що піддавалися ізольованій дії больового чинника. Так, максимальне збільшення больової чутливості при попередній дії ГК стресу наголошувалося в ТЕС (БП зменшився в середньому на 55,56%, $p < 0,01$), мінімальне - в ТГП (БП зменшився в середньому на 3,50%; $p < 0,05$ і РВБ - на 2,89%; $p < 0,05$). В ОТ і ФТ тривалості больових реакцій збільшилися в середньому на 37,45% ($p < 0,05$) і 9,95% ($p > 0,05$) відповідно. Дані результати підтверджуються динамікою КМ, значення якого, починаючи з сьомої доби обмеження рухливості, стали

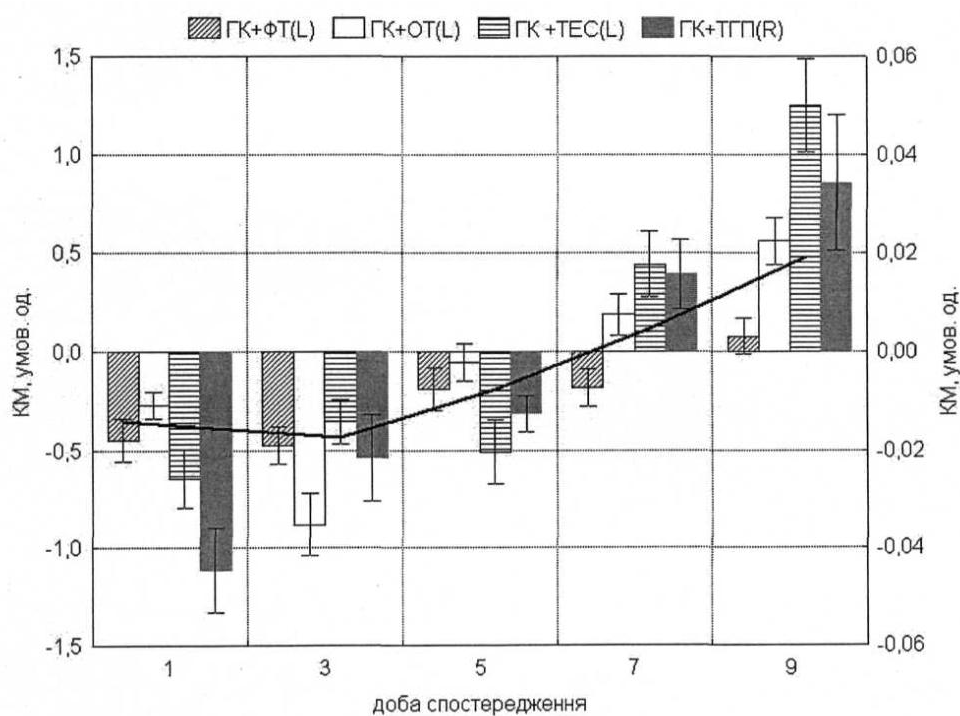
позитивними (від +0,02 до +1,25 ум. од. в різних больових тестах). Отже, в результаті дії модифікуючого чинника (ГК) больова чутливість щурів збільшувалася, що свідчить про негативний ефект модифікації (Фіг.1).

Такі зміни вивчених поведінкових феноменів при дії больових чинників на фоні ГК можуть бути пов'язані з тим, що 7-9-ти добове обмеження рухливості призводить до розвитку першої стадії загального адаптаційного синдрому, або стресу - реакції тривоги. Як показано в дослідженнях А.В. Михайлова (1985), перша стадія ГК стресу характеризується двофазним компонентом. Протягом перших трьох діб обмеження рухливості у експериментальних тварин виявлено збільшення активності ферментних систем нейтрофілів, що супроводжувалося активізацією фагоцитарної функції. Протягом 5-9 діб спостерігали протилежні зміни, які виражалися в значному пригнібленні досліджених ферментних систем нейтрофілів. Це призвело до зниження функціональної активності клітин, що виявлялося в неможливості повноцінного забезпечення їх фагоцитарної функції.

За даними Е.Н. Чуян з соавт. (2003) при 9-ти добовому ГК стресі відбувається прискорення синтезу адреналіну в мозковій речовині надниркових, посилення його виходу в кров, а також збільшення депонування катехоламінів еритроцитами, твердою мозковою оболонкою і тканиною вушечок міокарду, що свідчить про те, що в даних умовах відбувається генералізоване посилення активності САС.

На тлі збільшення активності стрес-ріалізуючих систем при тривалому ГК стресі відбувається зниження активності стрес-лімітуючих систем організму. Зокрема, показано, що після тривалих стресових дій не спостерігається збільшення рівня серотоніну в мозку, відбувається зниження вмісту серотоніна в лейкоцитах периферичної крові [Joseph MH, Kennett GA. In vivo voltammetry in the rat hippocampus as an index of drug effects on extraneuronal 5-HT //Neuropharmacology. -1981. -V.12B. -P.1361-1364]. Аналогічно цьому тривалий «патологічний» стрес, на відміну від короткочасного «фізіологічного», призводить не до підвищення, а до значного зниження концентрації енкефалінів в крові, порушенню процесів секреції та депонування їх в надниркових.

Таким чином, зміни больової чутливості тварин при ГК стресі можуть служити критерієм переходу еустресу в дистрес. Це може бути пов'язано з тим, що ключовою ланкою, що визначає схильність і стійкість організму до стрес-факторів, є рівень активності різних ланок стрес-лімітуючих і стрес-ріалізуючих систем, а також ступінь їх активації під впливом стресу. Отже, отримані дані свідчать про важливу роль функціонального стану організму взагалі й активності стрес-лімітуючих і стрес-ріалізуючих систем, зокрема, в регуляції больової чутливості.



Фіг. 1.