

УДК 577.3:594.38

## УЧАСТИЕ ОПИОИДНОЙ СИСТЕМЫ В РЕГУЛЯЦИИ ИНФРАДИАННОЙ РИТМИКИ ТЕРМОНОЦИЦЕПЦИИ МОЛЛЮСКОВ

<sup>1</sup>Темурьянц Н.А., <sup>1</sup>Туманянц К.Н., <sup>2</sup>Костюк А.С., <sup>1</sup>Туманянц Е.Н.

<sup>1</sup>Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь;

<sup>2</sup>Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, e-mail: timur328@gmail.com

Косинор-анализ параметров ноцицепции наземных моллюсков *Helix albenscens* выявил набор инфрадианных ритмов термоноцицепции, совпадающих с таковыми у позвоночных животных и человека. Установлено, что блокада опиоидных рецепторов налоксоном приводит к значительному нарушению инфрадианной ритмики термоноцицепции моллюсков, проявляющемся в изменении структуры спектров, резком сдвиге фаз выявляемых ритмов. При пребывании животных в условиях ферромагнитного экранирования, уменьшающего число выявленных периодов и сдвигающего фазы всех ритмов, блокада опиоидных рецепторов налоксоном не приводит к изменению числа периодов в спектре по сравнению с таковыми интактных животных, но вызывает резкий сдвиг их фаз. Делается вывод об участии опиоидной системы в регуляции инфрадианной ритмики термоноцицепции у наземных моллюсков *Helix albenscens*.

**Ключевые слова:** инфрадианная ритмика, термоноцицепция, моллюски, опиоидная система, налоксон, десинхронизация, ферромагнитное экранирование

## INVOLVEMENT OF THE OPIOID SYSTEM IN REGULATION OF INFRADIAN RHYTHMICITY OF THERMONOCICEPTION IN SNAILS

<sup>1</sup>Temuryants N.A., <sup>1</sup>Tumanyants K.N., <sup>2</sup>Kostyuk A.S., <sup>1</sup>Tumanyants E.N.

<sup>1</sup>V.I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol;

<sup>2</sup>Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, e-mail: timur328@gmail.com

Cosinor analysis was revealed infradian rhythms of thermonociception parameters in snails *Helix albenscens*, which coincides with that of vertebrates and humans. Blockade of opioid receptors with naloxone results in significant impairment of infradian rhythmicity of thermonociception that manifests in change in structure of the spectrum and significant shift of phases of identified rhythms. The injection of naloxone with desynchronosis, which develops in a ferromagnetic shielding, does not lead to a change in the number of periods in spectrum compared to intact animals. However, it causes it significant shift in their phases. A conclusion is being made that the opioid system is involved in regulating the infradian rhythmicity of thermonociception in snails *Helix albenscens*.

**Keywords:** infradian rhythmicity, thermonociception, snails, opioid system, naloxone, desynchronosis, ferromagnetic shielding

Несмотря на важность временной организации для функционирования биологических систем, многие аспекты ритмических изменений их состояния изучены совершенно не достаточно. Так, не исследованной остается инфрадианная ритмика (ИР) функциональных систем беспозвоночных. Между тем ее изучение помимо фундаментального имеет важное прикладное значение, т.к. применение этих животных в научных целях соответствует международным принципам Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов. В частности, в физиологических и биофизических исследованиях широко применяются моллюски, у которых регистрируются различные показатели функционального состояния, в частности, термоноцицепция [10], многодневная ритмика которой и ее регуляция изучены недостаточно.

Известно, что в регуляции термоноцицепции важную роль играют антиноцицептивные системы, в том числе опиоидная.

Расширению представлений об участии этой системы в регуляции ИР должны способствовать не только эксперименты на интактных животных, но и на моллюсках с моделированными изменениями ритмики, например, с экспериментально вызванным десинхронизмом. Являясь неспецифическим проявлением нарушения временной организации, десинхронизация всегда развивается при действии на организм факторов электромагнитной природы и может являться единственным свидетельством реакции организма на их воздействие. Поэтому для моделирования десинхронизации целесообразно использование электромагнитных воздействий. Тем более что в реакции организма на действие электромагнитных факторов вовлечена опиоидная система [3, 5, 8].

В связи с изложенным целью настоящего исследования явилось изучение ИР термоноцицепции у интактных моллюсков, а также у животных с моделированным десинхронизмом и исследование участия опиоидной системы в ее регуляции.

## Материалы и методы исследования

Для достижения поставленной цели проведены исследования на наземных брюхоногих моллюсках *Helix albescens*. В эксперименте использовались половозрелые животные, одинаковые по массе и размерам, которых содержали в светонепроницаемых стеклянных террариумах в условиях постоянного температурного режима ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), высокой влажности и избытка пищи.

Моделирование десинхроноза достигалось путем помещения животных в экранирующую камеру, изготовленную из двухслойного железа «Динамо».

В нашем исследовании применялась камера размером  $2 \times 3 \times 2$  м. Устройство и свойства камеры описаны нами ранее [2-4, 6]. В этой камере достигалось ослабление вертикальной составляющей геомагнитного поля (ГМП) в 4,4 раза, горизонтальной в 20 раз.

Изучение эффектов ФМЭ привлекает внимание исследователей различного профиля, что связано не только с необходимостью решения прикладных задач, заключающихся в выяснении неблагоприятных последствий пребывания и трудовой деятельности в таких условиях, но и с изучением ряда фундаментальных проблем [6]. ФМЭ вызывает изменения состояния ряда функциональных систем, но наиболее характерным экраноиндуцированным образом изменяемых в подавляющем расстройством является десинхроноз.

Освещенность внутри и вне камеры, а также внутри террариумов измерялась с помощью люксметра ТКЛ-ПКМ (модель 63). Внутри ящиков она колебалась от 0,1 до 0,2 лк, внутри экранирующей камеры и в лаборатории, в которой содержались моллюски контрольной группы, освещенность была такого же уровня, а в лаборатории, в которой проводили тестирование и уборку клеток, изменялась от 480 до 500 лк.

О состоянии термоноцицептивной чувствительности животных судили по порогу (П) и латентному периоду (ЛП) реакции избегания в тесте «горячая пластинка». Особенностью пластинки, примененной в исследовании, является то, что она изготовлена из стекла и на ее нижнюю поверхность методом распыления в вакууме нанесен нитрид титана. Все измерения проведены с соблюдением принципов двойного слепого эксперимента. Эксперименты проведены торократно.

Роль опиоидной системы изучали путем выключения опиоидных рецепторов налоксоном (Н). Н вводили в дозе 5 мг/кг в 0,2 мл физиологического раствора (ФР 0,6% р-р NaCl) в переднюю долю нижней поверхности подошвы животного.

Отобранных моллюсков делили на 2 группы: контрольные животные (I группа) и моллюски, подвергавшиеся действию ФМЭ (II группа). Животные контрольной группы находились за пределами камеры в той же комнате. Животные II группы – содержались в экранирующей камере по 22 часа в сутки в течение 21 суток.

Животные каждой выделенной группы были разделены на 3 равноценные подгруппы А и В и С, которые помещались в отдельные стеклянные террариумы. Каждая подгруппа состояла из 20 особей. Моллюски подгруппы А были интактны, животным подгруппы В вводился ФР, подгруппы С – Н. Растворы вводили за 15 мин до экспериментального воздействия.

Животные II группы извлекались из камеры ежедневно с 11.00 до 13.00 ч для измерения параметров термоноцицепции, которые проводили у каждого животного в течение 21 суток в лаборатории. У моллюсков контрольной группы измерения проводились с 9.00 до 11.00 ч. Таким образом, животные находились в условиях свет: темнота 2:22 ч.

Для статистической обработки данных использовали пакет специализированных программ «MedStat». Ежедневно вычисляли среднее значение ЛП и П животных каждой обследуемой подгруппы, ошибку средней. Математическую обработку коротких временных рядов физиологических данных проводили с помощью косинор-анализа, который основан на модели временного ряда как аддитивной смеси полезного сигнала и шума, где сигнал имеет форму косинусоиды с определенными параметрами. Для животных каждой группы были получены данные, характеризующие точность вписывания для каждого из периодов в диапазоне от 2,0 до 9,0 суток с шагом 0,1 суток.

В начале методом наименьших квадратов вычисляли значение амплитуды для каждой индивидуальной хронограммы, а затем для исследуемой выборки животных находили среднее значение спектральных параметров и ошибки средних. Для оценки достоверности изменений использовали t-критерий Стьюдента.

## Результаты исследования и их обсуждение

Анализ временной динамики исследованных показателей выявил наличие ритмической составляющей в их изменениях. Косинор-анализ измерений ЛП и П у интактных моллюсков позволил выявить набор инфрадианных ритмов, включающий в себя следующие периоды:  $\approx 2^{\text{д}}, 1$ ;  $\approx 2^{\text{д}}, 9$ ;  $\approx 3^{\text{д}}, 5$ ;  $\approx 7^{\text{д}}, 1$  (рис. 1). Сравнение фаз выделенных ритмов П и ЛП реакции избегания термического стимула выявило практически полное их совпадение.

При анализе результатов исследования ИР термоноцицептивной реакции моллюсков, которым ежедневно вводился ФР, не выявлено различий с данными интактных животных. Таким образом, болевое раздражение, вызванное инъекцией, а также введение ФР не влияло на ритмические изменения термоноцицепции.

Иной результат получен у интактных животных, которым вводили Н. В этом случае выявлено уменьшение числа выявляемых периодов. Не выявлялся самый короткий период  $\approx 2^{\text{д}}, 1$ . Кроме того, регистрировались выраженные сдвиги фаз в периодах  $\approx 2^{\text{д}}, 9$  и  $\approx 3^{\text{д}}, 5$  суток, когда фазы запаздывали относительно фаз моллюсков контрольной группы на  $272^\circ$  ( $p < 0,001$ ) и  $277^\circ$  ( $p < 0,001$ ) соответственно (рис. 2). Таким образом, блокирование опиоидной системы Н у интактных моллюсков приводит к нарушению ИР термоноцицепции.

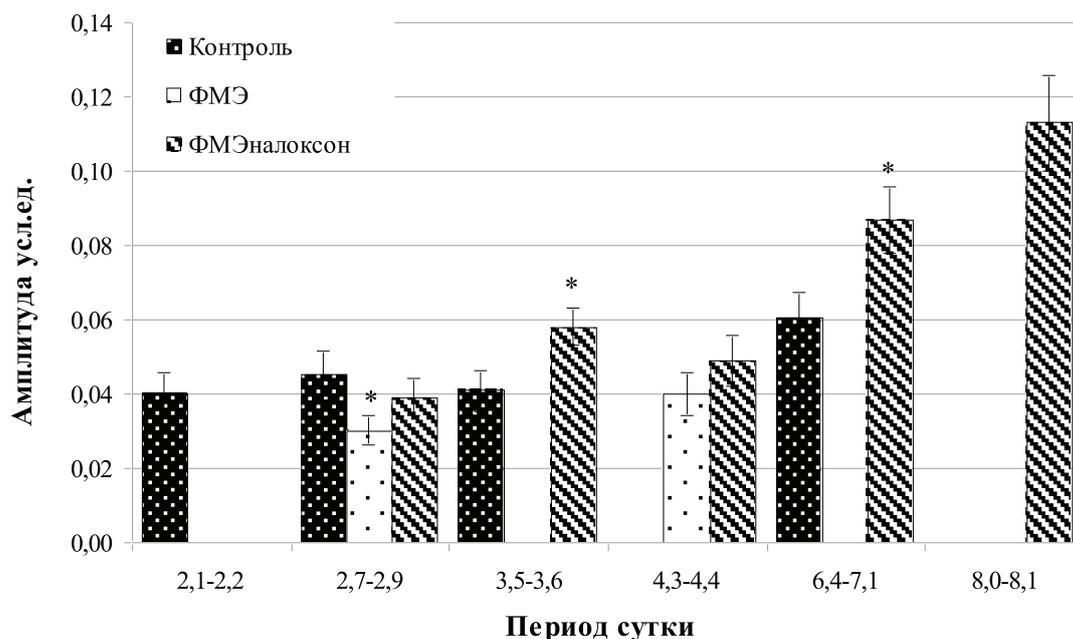


Рис. 1. Спектры периодов инфрадианных ритмов латентного периода термоноцицептивной реакции у моллюсков контрольной группы, группы животных, подвергнутых ФМЭ, а также группы животных, находящихся в условиях ФМЭ при введении налоксона. Примечание. \* – различия статистически значимы между данными интактных моллюсков и значениями у экспериментальных групп животных (\* –  $p < 0,05$ )

При анализе результатов исследования инфрадианной периодичности параметров термоноцицепции моллюсков, находившихся длительное время в условиях умеренного ФМЭ, выявлены ее существенные изменения, проявляющиеся в развитии десинхроноза. Десинхроноз диагностировался по уменьшению числа выявляемых периодов: наиболее часто выявлялись периоды  $2^d,9$  и  $4^d,4$ . Кроме того, амплитуда ритма  $\approx 2^d,9$  уменьшалась в 1,5 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с данными контрольной группы животных, а продолжительность выявляемого у интактных моллюсков периода  $\approx 3^d,5$  суток увеличивалась до  $\approx 4^d,4$ .

Блокирование опиоидных рецепторов Н у моллюсков, помещенных в условия ФМЭ, привело к изменению спектров ИР параметров термоноцицепции. Эти изменения выражались в изменении числа выявляемых периодов как по сравнению с контрольными животными, а также по сравнению как с интактными моллюсками, которым вводился Н, так и с интактными животными, находящимися в экране. Не выявлялся самый короткий период  $\approx 2^d,1$  суток, но появлялся новый – самый продолжительный период  $8^d,0$ , амплитуда которого была максимальна по сравнению с другими периодами (рис. 1).

Наиболее существенные изменения зарегистрированы в смещении фаз двух выде-

ленных периодов: сдвиг фаз по сравнению с данными как интактных моллюсков, так и животных, которым вводился Н. Кроме того, в периодах  $\approx 3^d,5$  и  $\approx 6^d,4$  отмечено возрастание амплитуды на 34% ( $p < 0,05$ ) и 29% ( $p < 0,05$ ) соответственно (рис. 1).

Таким образом, в этой группе животных по сравнению с теми, которые находились в условиях ФМЭ, наблюдались гораздо менее выраженные изменения. То есть, при введении неселективного блокатора опиоидных рецепторов Н животным, находящимся в условиях ФМЭ, значительно лимитируется развитие экраноиндуцированного десинхроноза.

Таким образом, результаты проведенного исследования убедительно свидетельствуют об участии опиоидной системы в регуляции ИР. У интактных животных блокирование опиоидных рецепторов Н приводит к развитию десинхроноза, а у животных, помещенных в условия ФМЭ, лимитирует его развитие.

В настоящее время установлено, что ведущую роль в временной организации биологических систем играет мелатонин (МТ) [7], ритм синтеза которого является не только часами, но и календарем [13], а также участвует в организации и ИР физиологических систем [1, 6].

Существенно и то обстоятельство, что эпифиз ответствен за организацию рит-

мов минутного и секундного диапазонов. Эти данные позволяют рассматривать ритм синтеза МТ как центральный водитель биологических ритмов [7]. МТ – эволюционно древняя молекула, обнаруженная практически у всех организмов, населяющих планету [11], он играет важную роль как межклеточный нейроэндокринный регулятор и участвует в регуляции разнообразных физиологических процессов.

Циркулирующий МТ реализует свое действие через МТ1 и МТ2 рецепторы, которые локализованы на мембранах клеток практически всех органов и тканей.

Была обнаружена тесная взаимосвязь между МТ и опиоидной системой. Так, МТ стимулирует синтез в различных структурах мозга  $\beta$ -эндорфина, а введение агонистов опиоидных рецепторов увеличивает уровень МТ в эпифизе крыс. Но решающее значение в развитии мелатонининдуцированной анальгезии играет активация им опиоидных рецепторов [9].

Их блокада Н изменяет не только активность опиоидной системы, но и ее ритмическую организацию. Именно с этим, по-видимому, связано изменения ИР термонцицепции у интактных животных, которым вводился Н. При блокаде опиоидных рецепторов следует ожидать и изменения ритми-

ки других диапазонов, что должно являться предметом дальнейших исследований.

В настоящее время накапливается все больше сведений об участии МТ в механизмах биологического действия электромагнитных факторов. Анализ литературных данных свидетельствует о том, что электромагнитные поля различных параметров вызывают принципиально одинаковые изменения: секреции гармона нивелирование ночного накопления МТ в эпифизе – основном месте его синтеза, изменение ритмики его секреции [12].

Ранее было обнаружено [2, 3], что при ФМЭ наблюдаются фазные изменения активности опиоидной системы, определяемые по влиянию Н на параметры реакции избегания термического стимула. Показано также участие МТ в изменении термонцицепции моллюсков и мышей при умеренном ФМЭ [4].

В условиях блокады опиоидных рецепторов при электромагнитных воздействиях, изменяющих ритмику секреции МТ, модифицируется временная организация процессов, контролируемых опиоидной системой. Таким образом, опиоидная система участвует в регуляции ИР термонцицепции. Дальнейшие исследования позволят детализировать механизмы такого действия.

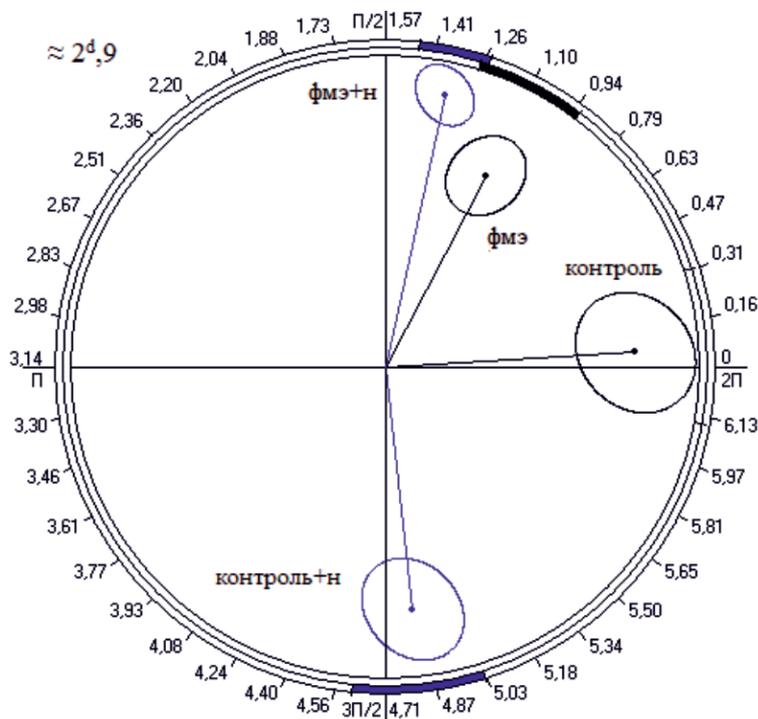


Рис. 2. Косинорограммы периода  $\approx 2^d,9$  (радианы) порога термонцицептивной реакции моллюсков контрольной группы, интактных животных при предварительном введении налоксона, а также у животных, находящихся в экранирующем объеме, при предварительном введении налоксона

Таким образом, косинор-анализ параметров ноцицепции моллюсков *Helix albescens* выявил набор инфрадианных ритмов, совпадающих с таковыми у позвоночных животных и человека.

Блокада опиоидных рецепторов налоксоном приводит к значительному нарушению инфрадианной ритмики, проявляющимся в изменении структуры спектров, резком сдвиге фаз выявляемых ритмов. При ферромагнитном экранировании, уменьшающем число выявленных периодов и сдвигающем фазы всех ритмов, блокада опиоидных рецепторов не приводит к изменению числа периодов в спектре по сравнению с таковыми интактных животных, но вызывает резкий сдвиг их фаз. Делается вывод об участии опиоидной системы в регуляции инфрадианной ритмики ноцицепции у моллюсков.

*Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 15-04-06054 (проект «Феноменология и механизмы действия слабых электромагнитных факторов: ослабленного электромагнитного поля Земли и низкоинтенсивного электромагнитного излучения крайне высокой частоты»).*

#### Список литературы

1. Владимирский Б.М., Сидякин В.Г., Темурьянц Н.А. и др. Космос и биологические ритмы – Симферополь, 1995. – 206 с.
2. Темурьянц Н.А., Костюк А.С. Переменное магнитное поле частотой 8 Гц корригирует активность опиоидной системы у моллюсков в условиях ферромагнитного экранирования. *Авиакосмическая и экологическая медицина*. – 2014. – Т. 48, № 3. – С. 45–50.
3. Темурьянц Н.А., Костюк А.С. Роль опиоидной системы в модуляции термоноцицептивной чувствительности моллюсков при действии слабых электромагнитных факторов. *Нейрофизиология*. – 2011. – Т. 43, № 5. – С. 432–441.
4. Темурьянц Н.А., Костюк А.С., Туманянц К.Н. Участие мелатонина в изменении ноцицепции моллюсков и мышей при длительном электромагнитном экранировании. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. – 2013. – Т. 99 (11). – С. 1333–1341.
5. Ходанович М.Ю., Гуль Е.В., Зеленская А.Е., Пан Э.С., Кривова Н.А. Долговременное ослабление геомагнитного поля повышает агрессивность лабораторных крыс и снижает активацию опиоидергических нейронов. *Вестн. Том. гос. ун-та. Биология*. – 2013. – Т. 1 (21). – С. 146–160.
6. Эффекты слабых электромагнитных воздействий у беспозвоночных животных (регенерация планарий, ноцицепция моллюсков) / Н.А. Темурьянц, Е.Н. Чуян, А.С. Костюк [и др.] – Симферополь: ДИАЙПИ, 2012. – 303 с.
7. Erren T.C., Reiter R.J. Melatonin: a universal time messenger. *Neuro Endocrinol Lett*. – 2015. – Vol. 36, Is. 3. – P. 187–192.
8. Frey A.H. Electromagnetic field interactions with biological systems. *FASEB J*. – 1993. – Vol. 274. – P. 272–281.
9. Lakin M.L., Miller C.H., Stott M.L., Winters W.D. Involvement of the pineal gland and melatonin in murine analgesia. *Life Sciences*. – 1981. – Vol. 29, Is. 24. – P. 2543–2551.
10. Prato F.S., Kavaliers M., Thomas A.W. Extremely low frequency magnetic fields can either increase or decrease analgesia in the land snail depending on field and light conditions. *Bioelectromagnetics*. – 2000. – Vol. 21. – P. 287–301.
11. Tan D.-X., Zheng X., Kong J., Lucien C. Fundamental issues related to the origin of melatonin and melatonin isomers during evolution: relation to their biological functions. *Int. J. Mol. Sci*. – 2014. – Vol. 15 (9). – P. 15858–15890.
12. Touitou Y., Selmaoui B. The effects of extremely low-frequency magnetic fields on melatonin and cortisol, two marker rhythms of the circadian system. *Dialogues in Clinical Neuroscience*. – 2012. – Vol. 14 (4). – P. 381–399.
13. Reiter R.J. The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia*. – 1993. – Vol. 49, Is. 8. – P. 654–664.