

VYUŽITÍ SYSTÉMU LABORAS PŘI STUDIU BOLESTI

LABORAS SYSTEM IN PAIN STUDIES

MILOSLAV FRANĚK, ŠIMON VACULÍN

*Ústav normální patologické a klinické fyziologie, 3. lékařská fakulta,
Univerzita Karlova v Praze, Praha*

SOUHRN

Systém LABORAS (Metris, Nizozemsko) umožňuje kontinuální monitorování spontánní motorické aktivity laboratorních myší a potkanů. Podle signálu z vibrační podložky dokáže rozlišit typ pohybu a výsledky automaticky zpracovat. Cílem naší práce bylo ověřit možnosti využití LABORASu při studiu bolesti. U modelu periferní neuropatické bolesti jsme prokázali pokles motorické aktivity, který přetrvával déle než 4 týdny po operaci a byl výraznější než u sham-operovaných zvířat. Při použití baklofenu (spasmolytika s analgetickým účinkem) jsme pozorovali na dávce závislý útlum motorické aktivity (vedlejší účinek baklofenu). Systém LABORAS se tedy ukázal jako vhodná metodika pro studie zabývající se měřením bolesti. LABORASem zjištěná spontánní motorická aktivita může být dalším z nepřímých parametrů naznačujících stupeň percepce bolesti u laboratorních zvířat.

Klíčová slova: LABORAS, motorická aktivita, baklofen, animální modely bolesti

SUMMARY

LABORAS (Metris, the Netherlands) enables continual monitoring of spontaneous motor activity of laboratory rats and mice according to the analysis of the platform vibrations generated by animal movements. The aim of our study was to employ the LABORAS system in the study of pain. We found decrease of motor activity in rats with peripheral neuropathic pain, the decrease lasted for more than 4 weeks and was higher than in sham-operated animals. Further, a dose dependent decrease of motor activity after administration of baclofen (spasmolytics with analgetic action) was demonstrated. The LABORAS system was found as a valuable tool in studies of pain. Spontaneous motor activity determined by LABORAS may form another important, although indirect parameter showing level of pain in animals.

Key words: LABORAS, motor activity, baclofen, animal models of pain

Franěk M, Vaculín Š. Využití systému LABORAS při studiu bolesti. *Psychiatrie* 2009; 13(4): 153–156.

Úvod

Systém LABORAS patří již více než 10 let do spektra metodik umožňujících automatické monitorování spontánní pohybové aktivity laboratorních hlodavců. Systém snímá vibrace plošiny, po níž se zvíře pohybuje, tento signál digitalizuje a automaticky z něj analyzuje různé typy motorické aktivity. Možnosti uplatnění LABORASu ve farmakologických studiích byly podrobně popsány v roce 2003 (Quinn et al., 2003), hlavní předností metodiky byla minimální účast experimentátora na registraci i analýze aktivity zvířete.

Je všeobecně známo, že nocicepční i neuropatická bolest je úzce spojena se změnami motorické aktivity. U chronických bolestivých stavů se celková spontánní motorika snižuje. U pacientů s chronickou bolestí se často doporučuje zvýšení fyzické aktivity a bylo potvrzeno, že cvičením navozená analgezie může patřit k důležitým postupům při léčbě periferní neuropatické bolesti (Kuphal et al., 2007). Na základě těchto faktů lze tedy předpokládat, že spontánní motorická aktivita může být jedním z markerů bolesti, může se zvyšovat nebo snižovat v závislosti na intenzitě vnímané bolesti. Proto jsme se rozhodli ověřit, zda lze systém LABORAS pro výzkum bolesti použít.

Možnosti využití LABORASu při studiu bolesti jsme směřovali do dvou oblastí: 1. Lze metodou LABORAS registrovat změny motorické aktivity u animálních modelů bolesti? 2. Lze metodou

LABORAS registrovat změny motorické aktivity po podání látky s antinocicepčním účinkem?

První oblast jsme ověřovali s využitím modelu PSNI – parciální poškození sedacího nervu (Seltzer et al., 1990). U tohoto modelu je popsána několik týdnů přetrvávající alodynzie/hyperalgezie na postižené končetině, kterou lze měřit jak termickými, tak mechanickými testy. Pro druhou oblast jsme jako vhodné analgetikum vybrali baklofen, u něhož jsou při analgetických dávkách popsány vedlejší účinky zahrnující pokles celkové motorické aktivity (Franěk et al., 2004).

Metodika

Zvířata

K experimentům byli použiti dospělí samci laboratorního potkana kmene Wistar (200–300 g; AnLab s.r.o.), kteří byli 14 dnů před experimentem umístěni v chovných nádobách ve skupinách po 4. Po celou dobu měli volný přístup k vodě a potravě, světelný režim v chovné místnosti byl nastaven na 12hodinový obrácený cyklus světlo/tma (tmavá perioda od 6:00 do 18:00). Kromě pokusu s 24hodinovým monitorováním pohybové aktivity byly všechny experimenty prováděny v tmavé fázi cyklu. Všechny experimenty byly provedeny se souhlasem Komise na ochranu zvířat 3. LF UK a jsou v souladu s pokyny Etické komise Mezinárodní společnosti pro studium bolesti (Zimmermann, 1983).

Stanovení pohybové aktivity systémem LABORAS

Systém LABORAS (Metris, Nizozemí) je tvořen trojúhelníkovou snímací plošinou (70 × 70 × 100 cm), která je na třech bodech fixována k stabilní základové desce. Na plošinu je umístěna průhledná plastová nádoba pro laboratorní zvíře (840 cm², výška 25 cm), jejíž dno je vystláno pilinami. Horní část nádoby (včetně krmítka a pítka) je připevněna ke kovovému rámu, který není spojen se snímací plošinou. Při pohybu zvířete registruje snímací plošina mechanické vibrace, které převádí na elektrický signál. Tento signál je zesílen, filtrován a digitalizován. Ve výsledné podobě se on line nahrává do PC. Příslušný software je schopen podle amplitudy, frekvence a charakteru signálu rozlišit různé typy motorické aktivity: chůze, grooming, panáčkování, šplhání, pití, příjem potravy a imobilitu. V experimentech popsanych v této práci byla registrována celková uražená dráha a imobilita.

Periferní neuropatie

V této studii byl použit model parciálního poškození sedacího nervu (Seltzer et al., 1990). V pentobarbitalové anestezii (50 mg/kg i.p.) byl potkanům vypreparován levý sedací nerv. Nylonovým 8-0 vláknem s 3/8 řezací jehlou byla následně 1/3 až 1/2 nervu pevně utažena do ligatury. Rána byla nakonec po vrstvách sešita. U sham-operovaných zvířat byl proveden zcela shodný zákrok, pouze nebyla založena ligatura na nervu. Na zvířatech z kontrolní skupiny nebyl proveden žádný chirurgický zákrok.

Aplikace analgetika

Intaktním potkanům byl podán baklofen (Sigma) v dávkách 1, 5 nebo 10 mg/kg s.c. Baklofen byl rozpuštěn v 10% roztoku arabské gumy (Sigma) ve fyziologickém roztoku. Toto rozpouštědlo bylo podáno kontrolní skupině. Všechny injekce byly podány v objemu 4 ml/kg. Bezprostředně po aplikaci byla zvířata v zatemněné místnosti umístěna do LABORASu a 2 hodiny byla monitorována jejich pohybová aktivita.

Statistická analýza

Výsledná data jsou uváděna jako aritmetické průměry ± standardní chyba průměru. Statistická signifikace byla vypočtena t-testem (Statistica 6.0). Za signifikantní byly považovány výsledky s $p < 0,05$.

Výsledky

1. Spontánní lokomoce během 24 hodin

V první fázi experimentu jsme ověřovali, jak se mění motorická aktivita během 12hod. cyklu světlo/tma. Protože oba dva další experimenty (model bolesti, podání analgetika) předpokládají snížení pohybové aktivity, pokusili jsme se nalézt fázi, při níž je spontánní motorická aktivita nejvyšší a případný pokles bude nejlépe měřitelný. Obrázek 1 ukazuje rozložení aktivity během 24 hodin. Za tuto dobu urazila pokusná zvířata v LABORASu dráhu 65,87 ± 4,15 m. Během 12hod. tmavé fáze byla délka dráhy 54,33 ± 7,94 m (82 % dráhy za 24 hod.), během světlé fáze 11,54 ± 3,77 m (18 % dráhy za 24 hod.). Nejdelsí vzdálenost byla zaznamenána v 7. hodině tmavé fáze (12,71 ± 1,13 m/hod.), naopak nejkratší vzdálenost (0,02 ± 0,008 m/hod.) v 11. hodině fáze světla. V tmavé fázi jsou tedy laboratorní potkani aktivnější ($p < 0,01$), a proto jsme všechny další experimenty s LABORASem prováděli v zatemnělé místnosti.

2. Změny motorické aktivity u modelu periferní neuropatické bolesti

U zvířat s modelem PSNI došlo po operaci k nesignifikantnímu poklesu spontánní lokomoce ve srovnání s intaktními nebo operovanými kontrolami (obrázek 2). Tento pokles se stal vzhledem k intaktním zvířatům signifikantním 14. den po operaci ($p < 0,05$) a v dalších týdnech se prohluboval (21. a 28. den $p < 0,01$). Vzhledem k sham-operovaným zvířatům se signifikantní pokles u PSNI objevil 21. den po operaci ($p < 0,05$) a i zde se 28. den prohloubil ($p < 0,01$).

3. Změny motorické aktivity po podání analgetika

Baklofen snižuje motorickou aktivitu v závislosti na dávce (obrázek 3). Po subkutánním podání dávky 1 mg/kg intaktním zvířatům se dráha uražená za 2 hod. (9,17 ± 2,38 m) signifikantně nelišila od kontrol (11,14 ± 2,12 m), kterým bylo podáno rozpouštědlo ve stejném objemu. U dávky 5 mg/kg s.c. již signifikantní pokles zaznamenan byl (4,33 ± 0,069 m/2 hod.; $p < 0,05$) a stejně tak i u dávky 10 mg/kg s.c. (1,81 ± 0,63 m/2 hod.; $p < 0,05$).

Diskuze

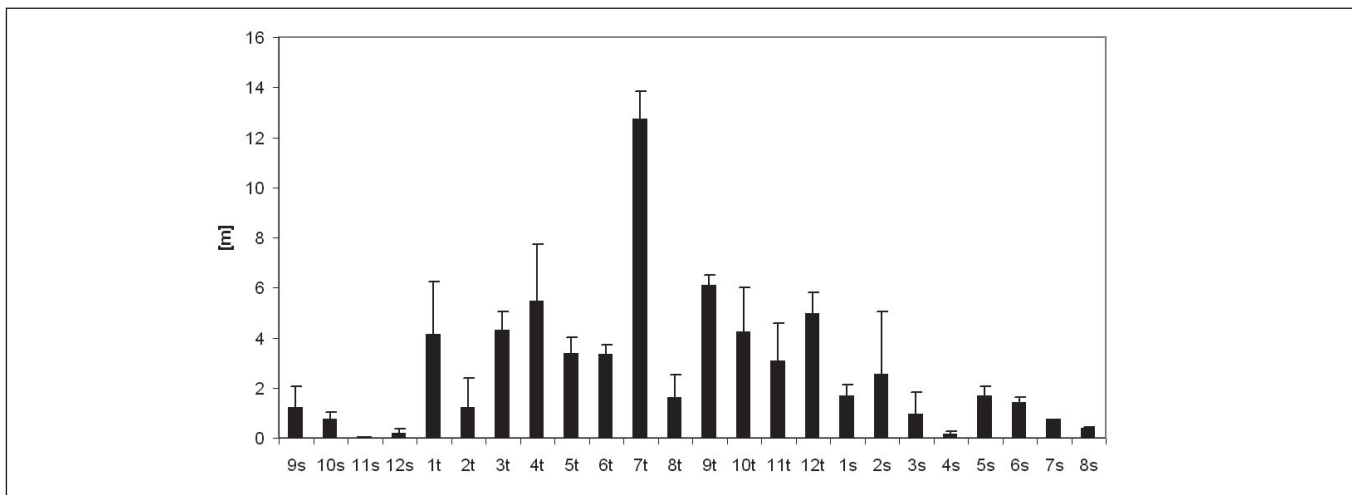
Nejběžnější metodikou, která se používá při měření stupně nocicepce u laboratorních zvířat, jsou behaviorální testy. Pro termický práh bolesti se nejčastěji používá plantar test (Hargreaves et al., 1988), tail flick test (D'Amour a Smith, 1941) a hot plate test. Pro stanovení mechanické hyperalgezie/alodynie se využívá test von Freyovými filamenti (Bell-Krotoski a Tomancik, 1987). Všechny tyto metodiky jsou však založené na externí stimulaci a vyvolání obranného reflexu, který nemusí být doprovázen pocitem bolesti, takže spíše popisují nocicepci než spontánní bolest (Vaculín et al., 2002). Navíc jejich výsledky závisí na mnoha parametrech – vlhkost a teplota vzduchu, přesný postup experimentátora, plocha kontaktu postižené končetiny s podložkou (Vrinten a Hamers, 2003). Výsledky mohou být navíc ovlivněny i opakovaným měřením (Chaplan et al., 1994), jemuž se zejména u testů s von Freyovými filamenti nelze vyhnout.

Vyhodnocování spontánní bolesti u zvířat je založeno buď na analýze 24hod. záznamů chování (etogram bolesti při viscerální bolesti, např. Giamberardino et al., 1995), nebo na míře automutilace (Vaculín a Rokyta, 2005). Automutilace se popisuje zejména u modelů deafferentačních bolestí, kde jsou stimulační metody nepoužitelné. Monitorování spontánní pohybové aktivity zvířete je tedy jednou z možností, jak lze měření spontánní bolesti zpřesnit. Naše práce ukazuje možnosti využití metody LABORAS u modelu periferní neuropatické bolesti (PSNI) a u měření účinků analgetik na motoriku (baklofen).

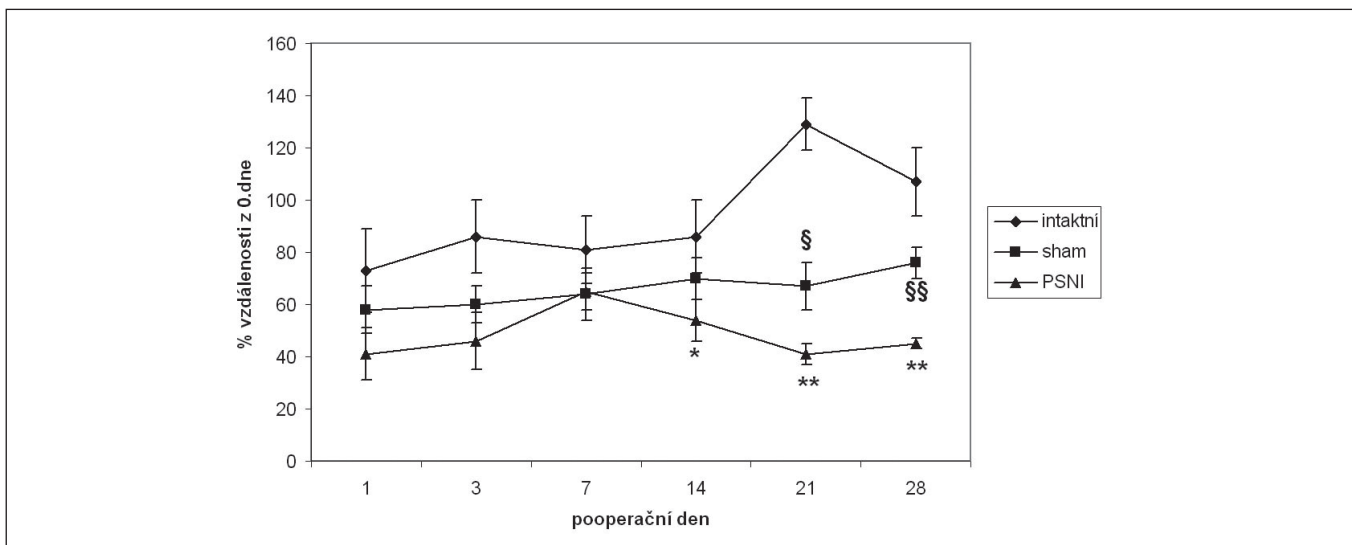
Všechny experimenty jsme prováděli v tmavé fázi 24 hod. světelného cyklu. Prokázali jsme totiž, že v této fázi je spontánní pohybová aktivita potkanů podstatně vyšší než za světla. Protože naše experimenty předpokládaly pokles lokomoce, bylo vhodnější se zaměřit právě na tmavou periodu.

Neuropatická bolest vzniká poškozením nebo dysfunkcí nervového systému podílejícího se na vedení bolesti. Obecně je terapeuticky obtížněji zvládnutelná než bolest nocicepční, a proto je již dlouhou dobu intenzivně studována, a to i za pomoci animálních modelů. V dnešní době patří mezi nejčastější animální modely periferní neuropatie chronická konstriktice sedacího nervu (CCI; Bennett a Xie, 1988), spared nerve injury (SNI); (Decosterd a Woolf, 2000) a parciální poškození sedacího nervu (Seltzer et al., 1990). Pro naši studii jsme vybrali PSNI proto, neboť neuropatická bolest u něj přetrvává delší dobu než u CCI a SNI. U SNI navíc nedochází ke změnám v prahu bolesti pro termickou stimulaci, ale pouze pro mechanickou (Decosterd a Woolf, 2000), což není u některých experimentů vhodné. U modelu PSNI jsme od 14. dne po operaci zaznamenali signifikantní pokles spontánní lokomoce, který se postupem času prohluboval. Tento výsledek je v souladu s prahy bolesti pro termickou stimulaci u zvířat po PSNI (Seltzer et al., 1990).

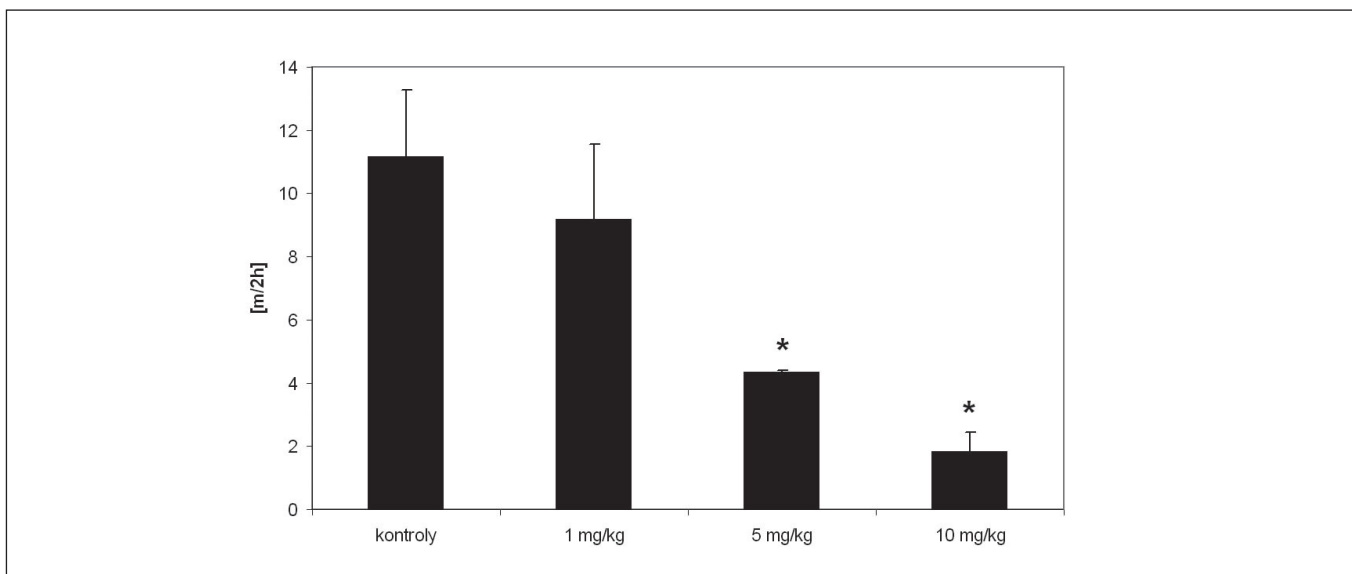
Baklofen (4-amino-3-[chlorofenyl] máselná kyselina) je dosud jediným klinicky používaným ligandem GABA-B receptoru, hlavního inhibičního metabotropního receptoru v centrálním nervovém systému savců (Bowery, 1993). V praxi se používá při léčbě spasticity kosterního svalstva. Mezi jeho nežádoucí účinky patří vedle gastrointestinálních obtíží a bolesti hlavy i ospalost a svalová slabost. Jeho analgetické účinky jsou známy již déle než 30 let (Levy a Proudfit, 1977). Kvůli nežádoucím účinkům je však jako analgetikum podáván až na výjimky pouze experimentálně (pro přehled Franěk, 2000). V naší práci jsme zvolili baklofen jako příklad analgetika, u něhož je možné sledovat účinky na motoriku v systému LABORAS. V subanalgetické dávce 1 mg/kg s.c. (Franěk et al., 2004) jsme signifikantní pokles motorické aktivity nezaznamenali, v analgetických dávkách však již přítomen byl a byl, stejně jako stupeň antinocicepce, na dávce závislý.



Obrázek 1: Rozložení spontánní motorické aktivity intaktních zvířat během 24 hodin. Jednotlivé sloupce odpovídají dráze v metrech ураžené za 1 hodinu. s – světlá fáze, t – tmavá fáze. Data udávají průměr + s.e.m., n = 6.



Obrázek 2: Změny spontánní motorické aktivity u modelu PSNI. Hodnoty udávají procento ze vzdálenosti, kterou zvířata urazila před chirurgickým zákrokem. Aktivita byla monitorována po 28 dní po operaci. Data udávají průměr ± s.e.m., n = 6–8. * p < 0,05 ve srovnání s intaktními, ** p < 0,01 ve srovnání s intaktními, § p < 0,05 ve srovnání s PSNI, §§ p < 0,01 ve srovnání s PSNI.



Obrázek 3: Účinek baklofenu na spontánní motorickou aktivitu. Útlum lokomoce jako vedlejší účinek baklofenu je u intaktních potkanů závislý na dávce. Data udávají průměr + s.e.m., n = 6–8. * p < 0,05 ve srovnání s kontrolami (rozpuštědlo).

Závěr

Systém na automatickou registraci a vyhodnocování pohybových vzorců LABORAS se ukázal jako vhodná metodika pro studie zabývající se měřením bolesti. V případě animálního modelu periferní neuropatie se prokázal profil spontánní motorické aktivity odpovídající dříve známým hodnotám prahů pro termickou stimulaci. V případě použití baklofenu potvrdil přítomnost motorického útlumu jako vedlejšího účinku. Po provedení experimentů, v nichž se stanoví přímá korelace mezi motorickými parametry a prahem bolesti, bude

tedy možné využívat LABORAS jako relativně objektivní metodiku umožňující studovat subjektivní modalitu bolesti.

Tato práce vznikla za podpory projektu č. MŠMT ČR 1M0517.

*doc. MUDr. Miloslav Franěk, Ph.D.
Ústav normální, patologické a klinické fyziologie
3. lékařská fakulta
Univerzita Karlova v Praze
Ke Karlovu 4
120 00 Praha 2*

LITERATURA

Bell-Krotoski J, Tomancik E. The repeatability of testing with Semmes-Weinstein monofilaments. *J Hand Surg Am* 1987; 12: 155-161.

Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 1988; 33: 87-107.

Bowery NG. GABAB receptor pharmacology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1993; 33: 109-147.

Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods* 1994; 53: 55-63.

D'Amour FE, Smith DL. A method for determining the loss of pain sensation. *J Pharmacol Exp Ther* 1941; 72: 74.

Decosterd I, Woolf CJ. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain* 2000; 87: 149-158.

Franěk M. Analgetické účinky baklofenu. *Bolest* 2000; 4: 191-195.

Franěk M, Vaculín S, Rokyta R. GABA(B) receptor agonist baclofen has non-specific antinociceptive effect in the model of peripheral neuropathy in the rat. *Physiol Res* 2004; 53: 351-355.

Giamberardino MA, Valente R, de Bigontina P, Vecchiet L. Artificial ureteral calculosis in rats: behavioural characterization of visceral pain episodes and their relationship with referred lumbar muscle hyperalgesia. *Pain* 1995; 61: 459-469.

Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* 1988; 32: 77-88.

Kuphal KE, Fibuch EE, Taylor BK. Extended swimming exercise reduces inflammatory and peripheral neuropathic pain in rodents. *J Pain* 2007; 8: 989-997.

Levy RA, Proudfit HK. The analgesic action of baclofen [beta-(4-chlorophenyl)-gamma-aminobutyric acid]. *J Pharmacol Exp Ther* 1977; 202: 437-445.

Quinn LP, Stean TO, Trail B, Duxon MS, Stratton SC, Billinton A, Upton N. LABORAS: Initial pharmacological validation of a system allowing continuous monitoring of laboratory rodent behaviour. *J Neurosci Methods* 2003; 130: 83-92.

Seltzer Z, Dubner R, Shir Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* 1990; 43: 205-218.

Vaculín Š, Franěk M, Hess L, Rokyta R. Ovlivnění nocicepcie medetomidinem a jeho kombinací s ketaminem u laboratorního potkana. *Psychiatrie* 2002; 6 (Suppl. 4): 14-17.

Vaculín Š, Rokyta R. Automutilace jako projev spontánní neuropatické bolesti u zvířat. *Česk fyziol* 2005; 54: 32-36.

Vrinten DH, Hamers FF. 'CatWalk' automated quantitative gait analysis as a novel method to assess mechanical allodynia in the rat; a comparison with von Frey testing. *Pain* 2003; 102: 203-209.

Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 1983; 16: 109-110.