

Što nam štakori mogu reći o boli? Krićka evaluacija testova ponašanja koji se koriste u eksperimentalnim modelima boli u glodavaca

What can rats tell us about pain? Critical evaluation of behavioral tests used in rodent pain models

Sapunar Damir

**Laboratorij za istraživanje boli, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu
Šoltanka 2, 21000 Split**

**Laboratory for Pain Research, University of Split School of Medicine
Šoltanka 2, 21000 Split**

Sažetak

Uspjeh translacijske medicine jako ovisi o životinjskim modelima i pripadajućim mjerama ishoda. Životinjski modeli neophodni su u istraživanju kronične boli i mnogo toga što danas znamo o boli dolazi upravo iz studija u kojima su korišćeni glodavci. Ipak, vrlo je malo otkrića iz temeljnih istraživanja na glodavcima rezultiralo uporabljivim terapijskim postupcima za lijećenje boli. U ovom pregledu predstaviti ću najvažnije modele i testove ponašanja koji se koriste u temeljnim istraživanjima boli, obrazložiti ogranićenja i predložiti načine kako što bolje koristiti te modele u budućim istraživanjima. Postoje brojne metodološke razlike i različite interpretacije testova ponašanja koji se koriste u procjeni boli u životinjskim modelima. Ove metodološke razlike treba prevladati kako bi se postigla kvalitetnija translacija rezultata istraživanja u klinički prihvatljive terapije. Rezultate ispitivanja ponašanja u životinjskim modelima boli treba uvijek uzimati s oprezom, potrebno je poboljšati prediktivnost modela, ukloniti izvore sustavnih pogrešaka u postojećim modelima te prihvatiti složenije mjere ishoda.

Ključne riječi: bol, kronična bol, životinjska modela, ponašanje

Abstract

The success of the translational medicine is heavily dependent on animal models and validated output measures. Animal models are a necessity in the study of chronic pain, and much of what we know about pain comes from studies in mice and rats. However, very few basic discoveries have been translated so far from rodent models into effective pain therapy. This review is presenting the most important rodent models and behavioral tests used in basic pain research, discussing their limitations and making recommendations for better use of these models in future studies. There is a lot of methodological diversity and different interpretations of behavioral tests that are used to assess pain in animal models. These methodological differences need to be resolved to achieve translation of research results into successful clinical therapeutics. More work is needed for determination of the most predictive animal models while the results of behavioral tests in animal pain models need to be considered with caution. Introduction of more complex behavior tests and further refinement of animal pain models should be encouraged.

Keywords: pain, chronic pain, animal models, behavior

Uvod

Istraživanje fenomena boli postalo je vrlo popularno tijekom 1970-ih i 1980-ih, kada je objavljena teorija "nadziranog ulaza" i kada je osnovano Međunarodno udruženje za istraživanje boli (IASP). Ti događaji privukli su mnoge istraživače u to područje što je izazvalo izniman porast broja publikacija o boli.

Velik dio onoga što danas znamo o boli temelji se na istraživanjima glodavaca. Nažalost, u liječenju boli još uvijek se većinom oslanjamo na "stare" lijekove. Pored nedostatka novih lijekova, još uvijek postoje značajni nedostaci u našem razumijevanju patofiziologije boli. Veoma malen broj temeljnih istraživanja u kojima se koriste životinje rezultira učinkovitim postupcima za liječenje boli. U ovom pregledu objasniti ću zašto je to tako i što je po mom mišljenju glavni problem temeljnih istraživanja boli u kojima se koriste glodavci.

Životinjski modeli u istraživanju boli

Uobičajeno ograničenje u razvoju određenog istraživačkog područja je nedostatak upotrebljivih životinjskom modelu. U istraživanju boli taj problem još je izraženiji zbog subjektivne prirode bolnog iskustva. Samo ljudi imaju sposobnost da izraze i opišu emocionalni aspekt bolnog iskustva. Ipak, brojni problemi u istraživanjima koja se provode na bolesnicima ili zdravim dobrovoljcima čine eksperimentalne životinjske modele nezamjenjivim u istraživanju boli. Takvi modeli pokušavaju oponašati humanu patologiju i rezultirati mjerljivom i ponovljivim senzornim deficitima (primjerice alodinijom, hiperalgezijom i spontanom boli) tijekom duljeg razdoblja [1] (za terminologiju vidjeti [2]). Ovi modeli obično izazivaju bol mehaničkom ozljedom, upalom, visceralnom iritacijom, kirurškim intervencijama ili eksperimentalno izazvanim bolestima [1, 3].

Što to mi mjerimo?

Budući da bol definiramo kao "neugodno osjetno i emocionalno iskustvo" [2, 4], najbolje što možemo učiniti u pokusima u kojima se koriste životinje je promatrati njihovo ponašanje i temeljem toga pretpostaviti o kakvom se "iskustvu" radi. Budući da svi naši testovi imaju tu inherentnu slabost mi možemo samo govoriti o indirektnim dokazima boli, tj. o ponašanju za koje smatramo da je povezano s boli.

Osim toga istraživanjima je dokazano da laboratorijsko okruženje ima snažan utjecaj na ponašanje životinja; sam istraživač, metodologija, sezona, vlaga, doba dana, spol, površina na kojoj se provodi testiranje, stres, smještaj životinja, rukovanje ili navikavanje na okolinu (pregled u [5-8]).

Rezultati testiranja ponašanja mogu ovisiti i o alatima koji se koriste. Najčešći alat za testiranje ponašanja povezanog s boli su von Frey filamenti koji nam omogućuju mjerenje

uzmicanja od podražaja rastućeg intenziteta. Nažalost, uzmicanje se registrira i nakon lažne pokusne operacije (engl. sham operacije) te na kontralateralnoj strani od ozlijeđenog živca [9-12]. Iz toga slijedi da testiranje uzmicanja s von Frey filamentima ne razlikuje ipsilateralnu (ozlijeđenu) od kontralateralne (neozlijeđene) strane ili od općeg stanja ozlijeđenog životinje. Brojni su pregledni članci koji opisuju ovu problematiku i koji kritički govore o testovima ponašanja koji se koriste u istraživanju boli [5, 13]. Ipak, bilo bi neprimjereno zaključiti da testovi koji se primjenjuju nisu do određene mjere pouzdani. Osim von Frey vlakana osmišljene su brojne inventivne metode za ispitivanje ponašanja.

Validacija testova ponašanja nakon ozljede spinalnog živca pokazala je a da je najbolja metoda za otkrivanje učinak ozljede *pin-prick* metoda [11]. U tom testu umjereni pritisak iglom na šapu štakora izaziva ili kratko refleksno povlačenja ili složeni hiperalgezijski odgovor koji karakterizira produženo podizanje, trešnja i lizanje šape [11]. Hiperalgezijski odgovor javlja se samo nakon podvezivanja živca, ne na kontralateralnoj strani ili u životinja iz lažne pokusne skupine. Ovakav odgovor stoga može biti prihvaćen kao pokazatelj uspješno izazvane neuropatske boli te je stoga prihvatljiva mjera ishoda u tom tipu istraživanja.

Brojne druge istraživačke skupine su također uočile vrijednost kompleksnih oblika odgovora u testovima ponašanja [14]. Kompleksni odgovori mogu biti rezultat operantnih modela [15] a mogu se procjenjivati i kroz izraze lica štakora. Pokazalo se da je društvena komunikacija boli u miševa koji se testiraju zajedno posredovana vizualnim signalima [16]. Ovaj nalaz sugerira da miševi mogu komunicirati bol kroz izraze lica. Stoga je formuliran standardizirani kodiranje sustav za izraze lica miševa sličan onom razvijenom za ljude [17]. Temeljem tog sustava stvorena je skala grimasa koja se sastoji od šest izraza "lica" boli. Uz pretpostavku da se ova ljestvica može koristiti za razne vrste boli i da se točnost metode poboljšava s treningom, sposobnost za pouzdano otkrivanje boli temeljem izraza lica miševa može značajno pridonijeti istraživanju boli i pružiti nam vrijedne informacije o životinji čije nam je subjektivno iskustvo inače nedostupno [18].

Razlike u vrstama i sojevima glodavaca

Većina gore navedenih eksperimentalnim modelima boli razvijeni su u štakora. Međutim, postoji jak motiv za korištenje ovih modela u brojnim genetski karakteriziranim sojevima miševa, posebno onih genetski modificiranih. Nažalost, primjena testova ponašanja nocicepcije u transgeničnih miševa je nedosljedna, a ponekad i loše kvalitete, što dovodi da nemogućnosti replikacije rezultata i pogrešnih zaključaka. Jedan od razloga za to je da su se štakorski modeli nekritički primijenili na miševima zanemarujući između ostalog anatomske različitosti štakora i miša [19]. Rigauld i suradnici su otkrili da sastav bedrenog ishijadičnog živaca nije jednak u štakora i miševa [19]. Mišji L3 i L4 segmenti su anatomski i funkcionalno homologni s štakorskim L4 i L5 segmentima. Korištenje uobičajenog modela

podvezivanja spinalnog živca u miševa treba stoga provoditi tako da se podvezuju L4 i eventualno L3 segmenti za razliku od originalno opisane metode koja se primjenjuje u štakora i kod koje su podvezivani L5 i L6 [20].

Razlike postoje i između pojedinih sojeva štakora pa tako Wistar štakori imaju jednak doprinos po L4 i L5 spinalnih živaca, dok Sprague-Dawley i Brown Norway štakori pokazuju nerazmjerni doprinos iz L5 živca u odnosu na L4 živca.

Navedene činjenice dovode u pitanje tumačenje rezultat istraživanja u kojima se L4 / L5 dominantna sastav ishijadičnog živca u štakora pogrešno uzima kao ispravan i u miševa. Takvih istraživanja ima nekoliko vrsta. U istraživanjima učinaka presijecanja spinalnog živca na tijela neurona spinalnog ganglija vjerojatno su se koristili uzorci tkiva koji odgovaraju spinalnim ganglijima čiji su periferni dijelovi presječeni. Veći problem predstavljaju one studije na miševima u kojima se istraživao utjecaj periferne ozljede (poput upale ili ozljede) na neurone spinalnog ganglija. U tim radovima promjene su vjerojatno tražene u L4 i L5 spinalnim ganglijima, ne L3 i L4. Uglavnom, moguće je da su miševi koji se koriste u tim istraživanjima različiti od onih korištenih u istraživanju Rigauda i suradnika [20]. Drugo, u slučaju pogrešne identifikacije ganglija rezultati će se razlikovati samo djelomično, jer L4 spinalni ganglij ispravno odražava efekt periferne ozljede. Također, postoji mogućnost korištenja odgovarajućih spinalnih ganglija ali uz krivu nomenklaturu, primjerice kad se ishijadični živac prati proksimalno i kad se pridruženi gangliji identificiraju kao L4 i L5.

Poziv za kvalitetnijim načinom znanstvenog izvješćivanja

Umjesto zaključka svi zainteresirani za istraživanje boli trebali bi kritički i uz oprez tumačiti rezultate testova ponašanja, odbaciti predrasude o prihvaćenim modelima, te upotrebljavati složenije mjere ishoda od jednostavnih refleksa uzmicanja. Prvi korak u tom smjeru mogao biti uporaba proširenog obrasca u kojem se opisuje način rada sa životinjama (dopunski materijal u [21]).

Literatura:

1. Hogan, Q., *Animal pain models*. Reg Anesth Pain Med, 2002. 27(4): p. 385-401.
2. Loeser, J.D. and R.D. Treede, *The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology*. Pain, 2008. 137(3): p. 473-7.
3. Wang, L.X. and Z.J. Wang, *Animal and cellular models of chronic pain*. Adv Drug Deliv Rev, 2003. 55(8): p. 949-65.
4. Taxonomy, I.A.f.t.S.o.P.S.o., *Pain terms: a list with definitions and notes on usage, recommended by the IASP subcommittee on taxonomy*. Pain, 1979. 6(3): p. 249-52.
5. Wilson, S.G. and J.S. Mogil, *Measuring pain in the (knockout) mouse: big challenges in a small mammal*. Behav Brain Res, 2001. 125(1-2): p. 65-73.
6. Chesler, E.J., et al., *Influences of laboratory environment on behavior*. Nat Neurosci, 2002. 5(11): p. 1101-2.
7. Vissers, K., et al., *Internal and external factors affecting the development of neuropathic pain in rodents. Is it all about pain?* Pain Pract, 2003. 3(4): p. 326-42.
8. Kosta, V., et al., *The extent of laminectomy affects pain-related behavior in a rat model of neuropathic pain*. Eur J Pain, 2009. 13(3): p. 243-248.
9. Ren, K. and R. Dubner, *Enhanced descending modulation of nociception in rats with persistent hindpaw inflammation*. J Neurophysiol, 1996. 76(5): p. 3025-37.
10. Koltzenburg, M., P.D. Wall, and S.B. McMahon, *Does the right side know what the left is doing?* Trends Neurosci, 1999. 22(3): p. 122-7.
11. Hogan, Q., et al., *Detection of neuropathic pain in a rat model of peripheral nerve injury*. Anesthesiology, 2004. 101(2): p. 476-87.
12. Yasuda, T., et al., *Effects of amitriptyline and gabapentin on bilateral hyperalgesia observed in an animal model of unilateral axotomy*. Pain, 2005. 115(1-2): p. 161-70.
13. Bove, G., *Mechanical sensory threshold testing using nylon monofilaments: the pain field's "tin standard"*. Pain, 2006. 124(1-2): p. 13-7.
14. Mogil, J.S. and S.E. Crager, *What should we be measuring in behavioral studies of chronic pain in animals?* Pain, 2004. 112(1-2): p. 12-5.
15. Vierck, C.J., P.T. Hansson, and R.P. Yezierski, *Clinical and pre-clinical pain assessment: are we measuring the same thing?* Pain, 2008. 135(1-2): p. 7-10.
16. Langford, D.J., et al., *Social modulation of pain as evidence for empathy in mice*. Science, 2006. 312(5782): p. 1967-70.
17. Ekman, P. and W.V. Friesen, *Facial Action Coding System: A Technique for the Measurement of Facial Movement*. 1978, Palo Alto: Consulting Psychologists Press.
18. Langford, D.J., et al. *The Mouse Grimace Scale (MGS): coding facial expressions of pain in the mouse.* in *Society for Neuroscience Abstract*. 2007.
19. Hogan, Q., et al., *Restoration of calcium influx corrects membrane hyperexcitability in injured rat dorsal root ganglion neurons*. Anesth Analg, 2008. 107(3): p. 1045-51.
20. Rigaud, M., et al., *Species and strain differences in rodent sciatic nerve anatomy: implications for studies of neuropathic pain*. Pain, 2008. 136(1-2): p. 188-201.
21. Rice, A.S., et al., *Animal models and the prediction of efficacy in clinical trials of analgesic drugs: a critical appraisal and call for uniform reporting standards*. Pain, 2008. 139(2): p. 243-7.