Биомедицина • № 2, 2011, С. 84-94

In vivo модели для изучения анальгетической активности

Д.А. Бондаренко[1], И.А. Дьяченко[1,2], Д.И. Скобцов[1,2], А.Н. Мурашев[1,2]

[1] — *Филиал Учреждения Российской академии наук Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Пущино*
[2] — *Пущинский государственный университет, Пущино*

Контактная информация: Бондаренко Дмитрий Александрович catameno777@gmail.com

В исследовании представлена батарея поведенческих тестов на термическое и химическое воздействие для определения анальгетической активности. Батарея тестов отвечает современным требованиям к исследованию фармакологически активных веществ проявляющих анальгетическую активность, и гуманному обращению с экспериментальными животными. В батарею включены тесты: оценка острой болевой чувствительности и потенциального анальгезирующего эффекта (тест «Горячая пластина»), хемогенная модель острой воспалительной реакции («Формалиновый тест»), чувствительность ноцицептивных рецепторов («Капсаициновый тест»), специфическая болевая реакция методом химического раздражения брюшины (тест «Уксусные корчи»), модель воспаления вызванного инфекцией (гиперчувствительность, спровоцированная CFA), исследование анальгетической активности в сочетании с блокатором опиоидных рецепторов (налоксон — чувствительная анальгезия). Данная батарея тестов полностью отвечает требованиям доклинического испытания новых фармакологически активных анальгетических средств.

Ключевые слова: модель *in vivo*, анальгетическая активность, гуманное обращение с животными, GLP.

Проведение всестороннего изучения активности потенциального лекарственного вещества (ЛВ) в экспериментах на животных является основной частью доклинических испытаний фармакологического исследования. На сегодняшний день исследование новых ЛВ, обладающих анальгетической активностью, занимает ~24% от общего числа исследований в мире [7]. Независимо от причин возникновения, многие острые и хронические заболевания сопровождаются болью, резко снижающие качество жизни человека, его социальную адаптацию, вызывая постоянные страдания. Именно болевые синдромы являются одной из основных причин обращения людей за врачебной помощью. Более 90% заболеваний ассоциированы с болью. Около 20% человечества страдает от хронической боли. Ежедневно свыше 30 млн. людей в мире принимают какой-либо анальгетик. Однако их прием является одной из самых типичных причин нежелательных реакций на фармакотерапию. По официальным оценкам, в США использование ненаркотических анальгетиков и нестероидных противовоспалительных препаратов ежегодно приводит более чем к 70 тыс. госпитализаций и 7 тыс. смертельных случаев [2].

Согласно формулировкам международного комитета экспертов, боль — это неприятное сенсорное и эмоциональное переживание, связанное с истинным или потенциальным повреждением ткани или описываемое в терминах такого повреждения [10]. Боль может быть классифицирована различными способами.

а) По локализации боли бывают:

• соматические поверхностные (в случае повреждения кожных покровов);

• соматические глубокие (при повреждении костно-мышечной системы);

• висцеральные (при повреждении внутренних органов).

б) По месту повреждения структур нервной системы выделяют боли:

• нейропатические, возникающие при повреждении периферических нервов;

• центральные, возникающие при повреждении структур ЦНС.

в) При не совпадении боли с местом повреждения возникают боли:

• проецируемые (например, при сдавливании спинномозговых корешков, боль проецируется в иннервируемые ими области тела);

• отраженные (возникают вследствие повреждения внутренних органов и локализуются в отдаленных поверхностных участках тела, т.е., боль отражается на соответствующем дерматоме по отношению к кожной поверхности).

г) По временным характеристикам боль бывает:

• острая (новая, недавняя боль, неразрывно связанная с вызвавшим ее повреждением и, как правило, являющаяся симптомом какого-либо заболевания, исчезает при устранении повреждения);

• хроническая (продолжается длительный период времени даже после устранения причины ее вызвавшей, часто приобретает статус самостоятельной болезни, например, воспалительный процесс) [6].

Детальные механизмы генерирования боли до конца не изучены. Ключевые компоненты рецепторной системы восприятия боли сосредоточены на ноцицепторных нейронах. Ноцицептивная афферентная система состоит из болевых рецепторов (ноцицепторов), болевых нервных волокон и нейронов в центральной нервной системе. Ноцицепторы — механические, термические и хеморецепторы, которые активируются теплом, электротоком и алгогенами (брадикинин, гистамин, серотонин, изменение концентрации ионов водорода и калия, простагландин Е, ацетилхолин, лейкотриены и ряд других биологически активных веществ). В 1997 году были открыты новые болевые хеморецепторы — ванилоидные (капсаициновые) рецепторы VRPV 1, локализуются на коже, глубоких тканях и внутренних органах, за исключением ткани мозга и печени.

Повреждающий стимул, полученный ноцицепторами, передаёт сигнал через спинной мозг далее в головной мозг. В передаче сигнала принимают участие Aβ-миелинизированные болевые нервные волокна — для механо- и терморецепторов и С-немиелинизированные — для хеморецепторов. В задних рогах спинного мозга болевые импульсы переключаются по трем путям проведения:

— в передних рогах спинного мозга — на двигательные мотонейроны (их возбуждение проявляется быстрым защитным двигательным рефлексом со стороны скелетных мышц);

— в боковых рогах спинного мозга — на вегетативные нейроны симпатического отдела нервной системы, стимуляция которой приводит к функциональной адаптации внутренних органов;

— в головном мозге — к структурам восприятия и оценки боли по двум путям.

Первый — специфический (неоспиноталамический, Aβ) путь — проводит «эпикритическую» (раннюю, короткую и острую) боль; медиатор — глутаминовая кислота.

Второй — неспецифический (палеоспиноталамический, С) путь — проводит

«протопатическую» (позднюю, тупую и длительную) боль; медиаторы — глутамат, и пептиды — тахикинины (субстанция Р, нейрокинин А), кальцитонин-генсвязанный пептид, и холецистокинин.

Центры боли (тела нейронов в ЦНС) — таламус, сенсомоторные области коры, лобная кора. Антиноцицептивная система — система подавления болевых ощущений. Состоит из 4 отделов — опиатного, каннабиоидного, глицинового и ГАМК-ергического.

Опиатная система — рецепторы 5 эндогенных анальгетических пептидов: лей-энкефалин, мет-энкефалин, динорфин А, динорфин В, β-эндорфин. Локализация опиатных рецепторов — пресинаптическая мембрана ноцицепторов (70%), окончания С-волокон, спинной и головной мозг.

Каннабиоидная система — CB1 и CB2 рецепторы. Их активируют производные арахидоната — анандамид и 2-арахидонил-глицерол.

Другие ингибиторы болевых импульсов — ГАМК, глицин, серотонин, дофамин и др.

Обезболивающие средства, применяемые в клинической практике, на разных уровнях воздействуют на различные уровни ноцицептивной системы.

К экзогенным анальгетикам, которые действуют на уровне задних рогов спинного мозга, относят:

1. Экзогенные опиоиды.

2. Препараты, воздействующие на ГАМК-ергические структуры для снижения возбудимости нейронов заднего рога (баклофен, тизанидин, габапентин).

3. Противосудорожные препараты (карбамазепин, дифенин, ламотриджин, вальпроаты и бензодиазепины), тормозящие проведение нервных импульсов по чувствительным нервам и обладающих агонистическим действием на ГАМК-ергические рецепторы нейронов задних рогов и клеток ядра спинномозгового пути тройничного нерва.

4. Агонисты α_2-адренорецепторов.

5. Блокаторы обратного захвата серотонина, повышающие концентрацию этого нейротрансмиттера в ядрах ретикулярной формации мозгового ствола, из которых исходят нисходящие тормозящие пути, воздействующие на интернейроны заднего рога (флуоксетин, амитриптилин).

5. Модуляторы активности TRPV1 рецептора.

6. Принципиально нового класса препаратов — SNEPCO (Selective NEuronal Potassium Channel Opener — селективных нейрональных открывателей калиевых каналов), оказывающих воздействие на процессы сенситизации нейронов заднего рога за счет стабилизации мембранного потенциала покоя (флупиртин, катадолон); антагонисты NMDA-рецепторов, «стирающих» болевую память (кетамин, декстраметорфан).

На уровне ствола мозга ингибирующее воздействие оказывается серотонинергическими и норадренергическими структурами. Умеренная кратковременная недостаточность серотонинергических структур приводит к развитию тревоги и боли, при длительно существующем дефиците серотонина может развиваться депрессия. Этим объясняется выраженное анальгетическое действие малых доз антидепрессантов при хроническом болевом синдроме даже при отсутствии антидепрессивного действия. Однако более высокая эффективность трициклических антидепрессантов по сравнению с ингибиторами обратного захвата серотонина может свиде-

тельствовать о большей роли норадренергических структур в формировании хронической боли.

Следующий синаптический уровень включает в себя таламус, лимбическую систему и прилежащие субкортикальные и кортикальные структуры головного мозга. Нейротрансмиттеры, оказывающие ингибирующее воздействие на проведение ноцицептивной информации из субкортикальных структур в кору, мало изучены, одним из них является γ-аминомасляная кислота. Предполагается, что именно на этом уровне оказывают анальгетическое действие антиконвульсанты.

Потенциальной точкой приложения анальгетиков являются каннабиноид-рецепторы (CB1 и CB2). Экспрессия CB2-рецепторов особенно выражена на воспалительных клетках, тогда как CB1-рецепторы локализованы в периферических ноцицепторах и центральной нервной системе. Антиноцицептивные свойства агонистов каннабиноидных рецепторов продемонстрированы в поведенческих и электрофизиологических экспериментах с использованием моделей острой боли и воспаления.

Локальные анестетики, блокируют периферические рецепторы (лидокаин и пр.). Наркотические анальгетики имитируют нейромедиаторные эффекты эндогенных опиоидных пептидов (энкефалинов и эндорфинов). Воздействие оказывается на уровне задних рогов спинного мозга. Механизм обусловлен взаимодействием наркотических анальгетиков с расположенными преимущественно пресинаптически опиатными рецепторами, что приводит к ингибированию межнейронной передачи болевых импульсов к ядрам таламуса, гипоталамуса, миндалевидному комплексу, повышению порога болевой чувствительности (увеличению интервала переносимости боли). Кроме того, наркотические анальгетики повышают активность и антиноцицептивной системы, энкефалинергических нейронов, на телах которых тоже есть так называемые опиатные рецепторы.

Патогенез боли вызванной воспалением или повреждением тканей обусловлен непосредственным раздражением или сенсибилизацией ноцицептивных нервных окончаний медиаторами воспаления. Источниками этих медиаторов являются поврежденные клетки тканей, кровеносные сосуды, стволовые клетки, лейкоциты [8]. По воздействию на периферические компоненты боли — соматические (воспаление, отек и др.) и нейрохимические (стимуляцию болевых рецепторов) наиболее выраженный эффект имеют нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП). Механизм анальгетического и противовоспалительного действия НПВП связан с угнетением активности циклооксигеназы (ЦОГ) в спинном мозге и на периферии — фермента, регулирующего биотрансформацию арахидоновой кислоты в простагландины (ПГ) — простациклин и тромбоксан.

Известны три изоформы ЦОГ, которые обозначаются как ЦОГ-1 ,ЦОГ-2 ,ЦОГ-3. ЦОГ-1 постоянно присутствующий в большинстве тканей, относится к категории «конститутивных» («структурных») ферментов, регулирующих физиологические эффекты простогландинов. ЦОГ-2 начинает экспрессироваться генами клеток эффекторов воспаления после первичной альтерации и усиливает воспаление. ЦОГ-3 преимущественно экспрессируется в клетках коры головного мозга, ингибируется парацетамолом, а также метамизолом и фена-

цетином. Принятая на сегодняшний день классификация НПВС выделяет неселективные ингибиторы ЦОГ, селективные ингибиторы ЦОГ-1, селективные ингибиторы ЦОГ-2, ингибиторы ЦОГ-3.

Целью данного исследования является, разработка и стандартизация методов изучения анальгетической активности, в соответствии с международными стандартами проведения экспериментов на лабораторных животных.

Термический ноцицептивный тест «Горячая пластина» *(hot plate)*

Основной стандартной операционной процедурой для измерения порога острой болевой чувствительности и потенциального анальгезирующего эффекта изучаемых фармакологических препаратов в ответ на термическое раздражение является тест «Горячая пластина» (Hot plate) [1]. Тест является базисным для исследования анальгетической активности, и используется для выявления анальгетически активных соединений подавляющих соматически поверхностную боль, и острую боль.

При помещении на горячую поверхность, с достижением порога болевой чувствительности со стороны животного наблюдаются двигательные реакции беспокойства: одергивание лап, облизывание подушечек лап и подпрыгивание. В данном тесте учитывается латентное время с момента помещения животного на горячую поверхность до первого облизывания передних и затем задних лап, а также латентное время первого подпрыгивания (любой попытки оторвать от поверхности одновременно все четыре лапы). Данная методика позволяет определять показатели: анальгетическая активность тестируемого объекта, пиковое время анальгезии, длительность анальгезии.

В исследованиях проводимых в ЛБИ для быстрой и эффективной проверки уровня обезболивания на мелких лабораторных животных использовался *Hot plate*-метр (*Hotplate Analgesia Meter, Columbus Instruments, USA* (Рис.1)). *Hot plate*-анальгезия-метр представляет собой термостатически контролируемую, электронагреваемую поверхность (254 мм × 254 мм × 19 мм), ограниченную прозрачными акриловыми стенками вариант клетки (19 см высотой, с открытым верхом). Передняя панель прибора оборудована кнопками для контроля времени с точностью до 0,1 секунды и температурного режима с точностью до 0,1°С. Температурный диапазон нагреваемой пластины от 30°С до 79,9°С.

До начала испытания в течение 10 минут тест-системы акклиматизируются в комнате для проведения исследования. В данном эксперименте следует использовать животных однократно, так как повторное помещение животного на термостатируемую пластину вызывает незамедлительную реакцию на касание поверхности. Каждая группа должна содержать не менее 10-12 животных. Термостат анальгезия-метра устанавливают на температуру 55°С. После инъекции исследуемого вещества животное аккуратно помещают на нагревательную пластину и в тот же момент нажимают кнопку «старт» на панели прибора. Отмечают латентное время облизывания передних и задних лап (с момента помещения животного на поверхность прибора до первого облизывания) и латентное время первого подпрыгивания. После этого нажимают на кнопку «стоп» и животное убирают с горячей поверхности. При этом остальные поведенческие реакции игнорируют. Для уменьшения вероятности теплового повреждения подушечек лап максималь-

ное время эксперимента не должно превышать 60 сек. Если животное не проявило активности в течение 60-секундного интервала, то его убирают с горячей поверхности, а за латентное время подпрыгивания принимают 60 сек., что и является основным при расчете МПЕ (максимального возможного эффекта). Исследование проводится минимум в трех дозировках для расчета $ЕД_{50}$. Для определения пикового времени анальгетического действия препарата измеряют латентный период у контрольной группы (точка 0) и через 15, 30, 45, 60, 90 и 120 сек. после введения препарата у тестируемых групп. Поверхность прибора протирается салфеткой, смоченной дезинфектантом (0,5% хлоргексидин-биглюконат на 70% этаноле), перед помещением на нее очередного животного [4].

Анализ данных определения анальгетической активности препарата: (данный вариант может быть использован как альтернатива стандартному представлению данных в виде mean ± sem):

1. Рассчитать среднее значение и стандартное отклонение латентности для контрольной группы.
2. Подсчитать число животных для данной дозы, у которых показатель латентности больше, чем сумма среднего и двух стандартных отклонений у контрольной группы.
3. Рассчитать процентное отношение таких животных для каждой дозы (конечная точка анальгезии).
4. Подсчитать процент животных, показывающих анальгетический эффект для каждой дозы.
5. Построить кривую дозы-эффекта, отложив дозу препарата по оси абсцисс, а процент животных с анальгетической активностью — по оси ординат.
6. Определить ED_{50}, т.е. дозу, необходимую для проявления 50%-й анальгетической активности препарата.
7. Построить кривую зависимости латентного периода по группам (ось y) от вводимой дозы препарата (ось x).

Анализ данных определения пикового времени анальгетического действия препарата:

1. Рассчитать средние значения, полученные от всех животных в группе для каждой дозы и стандартное отклонение.
2. Построить кривую зависимости латентного периода по группам (ось y) от времени после введения (ось x).
3. Оценить пиковое время анальгезии по максимальному значению латентного времени, представленного на графике.

Анализ данных определения продолжительности анальгетического действия препарата:

1. Рассчитать средние значения по группам.
2. Построить кривую зависимости латентности по группам от времени после введения.
3. Рассчитать площадь под кривой, которая является мерой длительности анальгезии и которая зависит от дозы препарата и его активности.

«Формалиновый тест»

Адекватной хемогенной моделью острой воспалительной реакции является «Формалиновый тест» (модель неспецифического воспаления). Известно, что болевая реакция на подкожное введение раствора формалина состоит из

Рисунок 1. Hot — plate Analgesia Meter, Columbus Instruments, USA

двух фаз. Первая фаза формалинового теста характеризует острую боль, возникающую в ответ на инъекцию химического раздражителя (длится около 5 мин) и связана в основном с прямой активацией тонких немиелиновых С-волокон, большинство из которых передаёт импульсацию от болевых рецепторов. Вторая фаза позволяет оценить тоническую боль и начинается через 10-15 мин после инъекции раствора формалина и длится более 1 часа (в зависимости от концентрации раствора формалина). Она является результатом развития воспалительного процесса в периферических тканях и изменений функции нейронов задних рогов серого вещества спинного мозга, где лежат нейроны болевых восходящих путей. Интенсивность болевого ответа в первую и во вторую фазы теста оценивают по продолжительности паттернов вылизывания (в секундах), типичной для данного теста поведенческой реакции мышей. Уменьшение продолжительности паттернов вылизывания доказывает наличие болеутоляющего действия у тестируемых объектов.

За 15 минут до начала опыта вводятся тестируемое вещество. Контрольным животным вводят эквивалентный объем стерильного физиологического раствора. По истечении 15 минут инъецируется 20 мкл 2% водного раствора формалина при помощи шприца Hamilton (25 мкл) с иглой 0,3 g, интраплантарно в подушечку задней лапы. Животное помещается в прозрачный бокс, одновременно с этим включалась программа-таймер, которая представляет собой секундомер с возможностью отметки временных точек. Интенсивность болевого ответа в первую и во вторую фазы теста оценивается по количеству и продолжительности паттернов облизывания (в секундах) инъецированной лапы в течение 60 минут. Время облизывания суммируется для каждого животного. После окончания опыта, полученные данные статистически обрабатываются [3].

«Капсаициновый тест»

Как известно наиболее простой путь боли обусловлен воспалением — непосредственное раздражение или сенсиби-

лизация ноцицептивных нервных окончаний медиаторов воспаления. В настоящее время изучен целый ряд рецепторов из семейства белков TRP-ионных каналов. Наиболее известным представителем данной группы является рецептор капсаицина TPRV1, открытие которого стало важным этапом в изучении природы болевых ощущений на молекулярном уровне. TRPV1 рецепторы находятся главным образом в ноцицептивных нейронах в периферической нервной системе, но они также были описаны во многих других тканях, в том числе центральной нервной системе. Чувствительность ноцицептивных рецепторов TPRV1 может быть активирована разнообразными экзогенными и эндогенными физическими и химическими раздражителями. Активация TRPV1 приводит к повышенной чувствительности на болевые стимулы (гипералгезии) или болевые ощущения в ответ на неболезненные раздражители (аллодинии), снижение температуры тела, усиление потоотделения. Исследование анальгетической активности в селективном тесте с агонистом TPRV1 капсаицином (капсаициновый тест) является необходимым в изучении специфической фармакологической активности [11]. Тест системе вводится тестируемый объект и/или «контрольный» объект. Через 15 минут вводится 10 мкл раствора капсаицина (3 мкг в 10 мкл 10% этанол растворенного в 0,9% NaCl) интраплантарно в подушечку левой задней лапы. После введения лапа протирается этанолом, для предотвращения накожного раздражения капсаицином. После введения отмечается время (латентный период), которое пройдет до начала реакции (мышь начнет сильно трясти лапой и облизывать её). Далее регистрируется количество паттернов облизывания и суммарное время облизывания лапы в течение 15 мин [4].

Тест «Уксусные корчи»

Тест направлен на исследование острой висцеральной и соматически глубокой боли. Специфическую болевую реакцию «корчи» методом химического раздражения брюшины (специфическая болевая реакция, сопровождающаяся характерными движениями животных, включающими сокращения брюшных мышц, чередующиеся с их расслаблением, вытягивание задних конечностей и прогибание спины (Acetic acid-induced writhing test , «Writhing» test, *Abdominal constriction test)*) вызывают внутрибрюшинным введением 0,6% уксусной кислоты (0,1 мл/10 г массы тела) [11]. Для выполнения теста необходимо зафиксировать в руке животное, собрав кожу на спинной поверхности так, чтобы кожа на брюхе была максимально натянута. При необходимости — зафиксировать хвост пальцами. Для выполнения инъекции животное опустить вниз головой под углом 45°. В таком положении кишечник сдвигается в брюшной полости вниз от места инъекции по направлению к опущенной голове. Место инъекции — нижний квадрант брюха справа или слева от белой линии обрабатывается антисептиком. Объем введения зависит от веса тела животного и требований протокола исследования. Оптимальный — 5-10 мл/кг, максимальный для крыс — 20 мл/кг, для мышей — 50 мл/кг. Используются шприцы объемом 1-2 мл с размером иглы 25-30 G (0,5-0,3 мм). Игла вводится в место инъекции, держа ее скосом вверх под углом 30°. Производится небольшая аспирация для проверки правильности попадания. Если игла введена правиль-

но, то при аспирации в шприц ничего не засасывается. Если отсасывается жидкость зелено-коричневого цвета, значит, игла попала в кишечник. Если жидкость желтого цвета — игла попала в мочевой пузырь. При аспирации в шприц любой жидкости раствор вводить нельзя. Необходимо сменить иглу и шприц, в шприц набрать новый раствор. При правильном положении иглы вводится раствор и медленно вынимается игла. Тест система помещается в испытательную камеру. В течение следующих 15 мин. после инъекций подсчитывают количество «корчей» возникающих в ответ на введение химического раздражающего агента для каждого животного. Анальгетический эффект оценивается по уменьшению количества «корчей» с одновременным вытягиванием по крайней мере одной задней конечности в процентах к контролю. Контрольным группам вводят изотонический раствор. Критериями эффективности при скрининге — снижение болевой реакции не менее чем на 50% [7].

Гиперчувствительность, спровоцированная CFA

Гиперчувствительность, спровоцированная CFA (модель воспаления вызванного инфекцией). Воспалительный процесс может формировать хронические боли соматически глубокого происхождения (повреждение подушечки лапы). Оценивается острая боль в тестировании и переносимости хронической боли. Протокол исследования направлен на оценку анальгетической активности после развития воспалительного процесса. В заднюю лапу тест системе субплантарно вводится 20μl смеси CFA (полного адъюванта Фрейда)/0,9% NaCl (1:1). Контрольная группа получает 0,9% NaCl, вторая контрольная группа экспериментальная группа получает CFA. Через 21 -24 часа после введения CFA экспериментальным животным вводится тестируемый объект, контрольным животным — 0,9% NaCl. Через 15 — 20 мин. проводится испытание порога болевой чувствительности в тесте «Горячая пластина» (t=55°C) контролируя только конечность, в которую вводили CFA. Отмечается время подпрыгивания и/или облизывания конечности, в которую вводили CFA [7].

Налоксон-чувствительная анальгезия

Исследование анальгетической активности в сочетании с блокатором опиоидных рецепторов осуществляется для оценки вовлечения опиатной системы в механизм анальгетической активности. Тестирование тест системы осуществляется в тесте «Горячая пластина». Влияние на опиоидные рецепторы идентифицируется по пробе с налоксоном (Naloxone hydrochloride) — неселективным антагонистом опиоидных рецепторов. Если введение налаксона снимает аналгезию, вызванную предварительно введенным тестируемым объектом, то это обнаруживает его тропность к опиоидным рецепторам и его действие оказывается налаксон-зависимым. Если такого эффекта налаксон не вызывает — агент налаксон-независим и не является лигандом опиоидной рецепторной системы [9].

Для определения возможного участия опиоидно-опосредованных механизмов предварительно, за 12-15 минут до введения исследуемого вещества, подкожно вводится 2,5 мг/кг налоксон. Затем вводится исследуемое вещество и через 15 минут, после введения исследуемого вещества животные помеща-

ются на нагревательную пластину Hot plate-метра (обычно 55°C) и отмечается латентное время облизывания передних и задних лап и первого подпрыгивания в ответ на термически индуцированную боль. Время, прошедшее до первого облизывания одной из лап или подпрыгивания животного считается временем реакции в контрольной и экспериментальных группах. Для предотвращения термического повреждения тканей максимальное время регистрации латентного периода не должно превышать 60 сек. Выявление антагонизма анальгетической активности тестируемого объекта в тесте с налоксоном (укорочение латентного периода болевой чувствительности) может свидетельствовать о его опиоидно-опосредованном механизме действия.

Выводы

Таким образом, представлены основные направления по исследованию анальгетической активности новых фармакологически активных веществ. Включающие в себя: оценку острой болевой чувствительности и потенциального анальгезирующего эффекта (тест «Горячая пластина»), хемогенная модель острой воспалительной реакции («Формалиновый тест»), чувствительность ноцицептивных рецепторов («Капсаициновый тест»), специфическая болевая реакция методом химического раздражения брюшины (тест «Уксусные корчи»), модель воспаления вызванного инфекцией (гиперчувствительность спровоцированная CFA), исследование анальгетической активности в сочетании с блокатором опиоидных рецепторов (налоксон — чувствительная анальгезия). Данная батарея тестов полностью отвечает требованиям доклинического испытания новых фармакологически активных анальгетических средств в соответствии с ГОСТ Р53434-2009 «НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ПРИНЦИПЫ НАДЛЕЖАЩЕЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ПРАКТИКИ (Principles of good laboratory practice)» утвержденным 2010-03-01.

Работа выполнена в рамках ФЦП Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы (ГК № 02.740.11.0773).

Список литературы

1. ***Вальдман А. В., Игнатов Ю. Д.*** Центральные механизмы боли. — Л.: Наука. — 1976.
2. http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/NewsEvents/FDA-VeterinarianNewsletter/ucm190729.html
3. ***Merskey H, Bogduk N.*** Classifcation of Chronic Pain. IASP Press Seattle, WA. — 1994.
4. Методические рекомендации для обучаемых. Фармацевтический факультет ГОУ ВПО ММА им. И.М.Сеченова Росздарва. — Москва. — 2006.
5. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Под ред. Р.У. Хабриева. — М.: Медицина. — 2005.
6. ***Eddy N.B., Leimbach D. J.*** // Pharmacol Exp Ther. — Mar; 107(3):385-93. — 1953.
7. ***Narender R. Gavva, Rami Tamir, Yusheng Qu, Lana Klionsky, T. J. Zhang, David Immke, Judy Wang, Dawn Zhu, Todd W. Vanderah, Frank Porreca, Elizabeth M. Doherty, Mark H. Norman, Kenneth D. Wild, Anthony W. Bannon,***

Jean-Claude Louis, and James J. S. Treanor // The journal of pharmacology and experimental therapeutics. — 2005. — Vol. 313. — No. 1. — p. 474–484.

8. ***David J. Matson, Daniel C. Broom, Susan R. Carson, James Baldassari, John Kehne, and Daniel N. Cortright.*** The journal of pharmacology and experimental therapeutics. — 2001. — Vol. 320. — No. 1. — p. 194–201.

9. ***Konrad C., Schmelz M.*** // Mechanismen der Schmerzentstehung. Internist. — 200546. — p. 1115-1121.

10. ***Koster R, Anderson M, Beer EJ.*** Acetic acid for analgesic screening. Fed Proc. — 1959. — 18:412–413.

11. ***Lu Yu, Fei Yang, Hao Luo, Feng-Yu Liu, Ji-Sheng Han, Guo-Gang Xing and You Wan*** // Molecular Pain. — 2008. — 4:61 doi:10.1186/1744-8069-4-61.

In vivo models of studying of analgetic activity

D.A. Bondarenko, I.A. Dyachenko, D.I. Skobtsov, A.N. Murashev

The article describes the set of behavioral tests that use the thermal and chemical effect to determine the analgesic activity. It meets contemporary requirements for a study of the pharmacologically active materials with analgesic activity, and to ethical treatment of experimental animals. The described tests: the evaluation of sharp painful sensitivity and potential analgesic effect («Hot plate» test), the chemogenic model of the sharp inflammatory reaction (Formalin-Induced Nociception), the sensitivity of the nociceptive receptors (Capsaicin-Induced Hyperalgesia), Abdominal Constriction Test of Visceral Pain (Acetic acid induced writhings), the model of the inflammation caused by the infection (Complete Freund's Adjuvant–Induced Thermal Hyperalgesia), the study of analgesic activity in combination with the blocker of the opioid receptors (nolaxone-sensitive analgesia). This set of tests completely satisfies the requirements of preclinical testing of new pharmacologically active analgesic substances.

Key words: *in vivo* models, analgesic activity, ethical treatment of animals, GLP.